

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE LA TACE
PAR LA CYTOKINE TNF α ET L'HYPOXIE
VIA LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION HIF-1 ET NF- κ B**

Par

Martine Charbonneau

Département de pédiatrie, Service d'immunologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine en
vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en immunologie

23 août 2005



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

ISBN: 978-0-494-25964-1

Our file Notre référence

ISBN: 978-0-494-25964-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	i
LISTE DES FIGURES	iv
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS UTILISÉES	vii
RÉSUMÉ	x
1- INTRODUCTION	
1.1 Métalloprotéinases de la famille ADAM	1
1.1.1 Identification de la TACE	1
1.1.2 Origine et structure de la famille d'enzymes ADAM	2
1.1.3 Localisation cellulaire et tissulaire des ADAM	8
1.1.4 Spécificité de maturation des substrats des ADAM	12
1.1.5 Implications de la TACE lors de phénomènes physiologiques et pathologiques	17
1.1.5.1 Développement et différenciation	17
1.1.5.2 Système immunitaire	18
1.1.5.3 Pathologies humaines	20
1.1.6 Régulation de la TACE	21
1.2 Polyarthrite rhumatoïde	23
1.2.1 Étiologie de la polyarthrite rhumatoïde	24
1.2.2 Développement de la pathologie	25
1.2.3 Hypoxie	29
1.2.3.1 Structure et activation du HIF-1	31

1.2.3.2 Implication du HIF-1 dans la polyarthrite rhumatoïde	39
1.2.4 Le TNF alpha	40
1.3 Objectifs et pertinence de la présente recherche	46
2- MATÉRIEL ET MÉTHODES	
2.1 Culture primaire de synoviocytes de type B	49
2.2 Cultures cellulaires	49
2.3 RT-PCR et PCR quantitatif en temps réel	50
2.4 Préparation des lysats cellulaires et extraits nucléaires	53
2.5 Immunobuvardage de type Western	54
2.6 Microscopie confocale	56
2.7 Dosage du TNF α par ELISA	57
2.8 Construction des plasmides pour les transfections transitoires	58
2.9 Essais luciférase	59
2.10 Analyse statistique	60
3- RÉSULTATS	
3.1 Induction de l'ARN messager de la TACE par le TNF α et l'hypoxie	61
3.2 Accumulation de la protéine TACE par le TNF α et l'hypoxie	63
3.3 Impact de la stimulation hypoxique et de la stimulation par le TNF α sur l'activité protéolytique de la TACE	66
3.4 Régulation de l'activité du promoteur de la TACE par le TNF α et l'hypoxie	66
3.5 Accumulation du facteur de transcription HIF-1 bioactif	71

3.6 Identification des segments du promoteur de la TACE impliqués dans la régulation hypoxique	75
3.7 Importance du HIF-1 dans la régulation du promoteur de la TACE	77
3.8 Implication du facteur de transcription NF- κ B dans la régulation du promoteur de la TACE par le TNF α	82
3.9 Effet des glucocorticoïdes sur l'induction hypoxique de l'activité du promoteur de la TACE	86
4- DISCUSSION	88
5- CONCLUSION	104
6- REMERCIEMENTS	106
7- RÉFÉRENCES	108

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Structure des principales familles d'enzymes de la superfamille de métalloprotéinases metzincin dépendantes du zinc.	4
Figure 2 :	A) Maturation de la TACE.	6
	B) Exemple de l'activité protéolytique de la TACE.	6
Figure 3 :	Illustration d'une coupe de l'articulation du genou humain sain comparé à un genou humain arthritique.	27
Figure 4 :	Représentation schématique des domaines fonctionnels du HIF-1 α et du HIF-1 β .	35
Figure 5 :	Illustration de la régulation normoxique et hypoxique de l'expression et de l'activité du HIF-1 α .	37
Figure 6 :	Voies de signalisation du TNF α .	43
Figure 7 :	Hypothèse de recherche.	48
Figure 8 :	Induction de l'ARNm de la TACE par le TNF α et l'hypoxie.	62
Figure 9 :	Accumulation de la protéine TACE régie par le TNF α et l'hypoxie.	64
Figure 10 :	Impact de la stimulation hypoxique et de la stimulation par le TNF α sur l'activité protéolytique de la TACE.	67
Figure 11 :	Séquence du promoteur de la TACE provenant de cellules RAW264.7.	69
Figure 12 :	Séquence du promoteur de la TACE provenant de cellules de souris C57Bl6/J.	70
Figure 13 :	Stimulation de l'activité du promoteur de la TACE par le TNF α et l'hypoxie.	72

Figure 14 : Production du HIF-1 fonctionnel suite au traitement par le TNF α et l'hypoxie.	74
Figure 15 : Identification des segments du promoteur de la TACE impliqués dans l'induction de son activité en hypoxie.	76
Figure 16 : Importance du facteur de transcription HIF-1 pour l'induction de l'activité du promoteur de la TACE en condition hypoxique.	79
Figure 17 : Inhibition de l'induction de l'activité du promoteur et de l'ARNm de la TACE en l'absence de HIF-1 fonctionnel.	81
Figure 18 : Implication du facteur de transcription NF- κ B dans la régulation du promoteur de la TACE par le TNF α .	84
Figure 19 : Effet de la dexaméthasone sur l'induction hypoxique de l'activité du promoteur de la TACE.	87
Figure 20 : Schéma récapitulatif des résultats.	103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I :	Localisation tissulaire des ADAM humaines.	9
Tableau II :	Liste des principaux substrats et fonctions des principales ADAM humaines ayant une activité métalloprotéinase connue.	16
Tableau III :	Classification fonctionnelle des substrats de la TACE.	16
Tableau IV :	Liste des principaux gènes dont l'expression est régulée par le facteur de transcription HIF-1.	32
Tableau V :	Liste des oligonucléotides utilisés au cours de la présente recherche ainsi que leur séquence.	52

LISTE DES ABBRÉVIATIONS UTILISÉES

ADAM :	a disintegrin and metalloprotease
ADAM-TS :	a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin domain
ADN :	acide désoxyribonucléique
ADNc :	acide désoxyribonucléique complémentaire
APP :	protéine précurseure amyloïde
ARD1 :	ADP ribosylation factor domain protein 1
ARN :	acide ribonucléique
ARNm :	acide ribonucléique messenger
BSA :	albumine de sérum bovin
bHLH :	hélice-boucle-hélice basique
ChIP :	immunoprécipitation de chromatine
CMHII :	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
DMEM :	Dulbecco's modified eagle medium
EGF	epidermal growth factor
FBS :	sérum de veau fœtal
FGF :	fibroblast growth factor
FIH-1 :	facteur inhibiteur du HIF-1
GM-CSF :	granulocyte/macrophage-colony stimulating factor
GR :	récepteur aux glucocorticoïdes
GRE :	éléments de réponse aux glucocorticoïdes
HAS :	HIF-1 ancillary sequence
HB-EGF :	heparin-binding-epidermal growth factor

HBS :	hypoxia binding sequence
HIF-1 :	facteur inductible à l'hypoxie
HLA :	antigène leucocytaire humain
HRE :	éléments de réponse à l'hypoxie
IFN γ :	interféron- γ
IGFBP-3 :	insulin-like growth factor-binding protein 3
I κ BSR :	I κ B super répresseur
IL :	interleukine LPS : lipopolysaccharides
MEF :	fibroblastes de souris embryonnaires
MEM :	minimal essential medium
MMP :	métalloprotéinase de la matrice
NF- κ B :	nuclear factor κ B
NLS :	signal de localisation nucléaire
ODDD :	domaine de dégradation dépendante de l'oxygène
PACE4 :	paired basic amino acid cleavage enzyme 4
PAI-1:	plasminogen activator inhibitor 1
pb :	paire de bases
PBS :	saline tamponnée au phosphate
PDGF :	platelet derived growth factor
PHD :	prolyl hydroxylase-domain containing protein
PR :	polyarthrite rhumatoïde
pVHL :	protéine suppresseuse de tumeur von Hippel Lindau
qRT-PCR :	PCR quantitatif en temps réel

RIP1 :	receptor interacting protein 1
RT-PCR :	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SVMP :	snake venom metalloprotease
TACE :	<u>T</u> NF- <u>a</u> lpha <u>c</u> onverting <u>e</u> nzyme
TAD :	domaine de transactivation
TGF β :	tumor growth factor- β
TIMP-3 :	tissue inhibitor of metalloproteases 3
TNF α :	tumor necrosis factor- α
TNFR :	récepteur pour le TNF α
TRADD :	TNFR1-associated death domain protein
TRAF :	TNF-receptor-associated factor
VEGF :	vascular endothelial growth factor

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**ÉTUDE DE LA RÉGULATION DE L'EXPRESSION DE LA TACE
PAR LA CYTOKINE TNF α ET L'HYPOXIE
VIA LES FACTEURS DE TRANSCRIPTION HIF-1 ET NF- κ B**

Par

Martine Charbonneau

Département de pédiatrie, Service d'immunologie

Mémoire présenté le 23 août 2005 à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade
de maître ès sciences (M. Sc.) en immunologie

RÉSUMÉ

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immunitaire touchant environ 1 % de la population mondiale. Elle représente l'une des formes d'arthrite les plus sévères parmi plus de cent formes diagnostiquées à ce jour. Malheureusement, l'étiologie de cette maladie n'est pas encore connue et il n'existe aucun traitement curatif. Cette pathologie dégénérative est caractérisée par l'inflammation et l'hypertrophie de la membrane synoviale causant des dommages irréversibles à plusieurs articulations tels que la destruction du cartilage et l'érosion des os. Plusieurs molécules participent au développement de cette affection, notamment des facteurs de croissance, des métalloprotéinases ainsi que des cytokines. De celles-ci, le TNF α est l'une des plus importantes.

En effet, il a été démontré que cette cytokine pro-inflammatoire puissante est essentielle dans la pathogenèse de la PR. Pour ce faire, le TNF α transmembranaire doit être clivé par la TACE pour générer sa forme soluble et active. Donc, la TACE, via son action protéolytique sur le TNF α , est impliquée dans la progression de la PR. De plus, il a été démontré que cette protéase transmembranaire est induite au niveau des articulations arthritiques et que l'inhibition de cette enzyme diminue les symptômes chez les rats atteints d'arthrite. Ceci en fait donc une cible thérapeutique intéressante, d'où l'importance de comprendre sa régulation et son mode d'action.

Afin d'étudier la régulation de la TACE en conditions inflammatoires, nous avons choisi deux agents importants dans le développement de la PR. On sait depuis longtemps que l'hypoxie, soit le manque d'oxygène, est une condition souvent présente au niveau des articulations arthritiques et que ces dernières sont caractérisées par des concentrations élevées de TNF α . Nous avons donc testé l'influence de ces deux stimuli sur la modulation de l'ARN messenger de la TACE chez les deux principaux types cellulaires composant la membrane synoviale, soit les macrophages (synoviocytes de type A) et les synoviocytes de type B. Nous avons démontré, par RT-PCR, que l'hypoxie et le TNF α induisent l'accumulation de l'ARN messenger de la TACE et que ces inductions sont dépendantes de la synthèse de l'ARN. De plus, nous avons établi que ces inductions au niveau de l'ARN messenger corrélaient avec l'accumulation de la protéine TACE et l'augmentation de son activité protéolytique chez les synoviocytes de type B stimulés par le TNF α et en condition hypoxique.

Nous avons ensuite cloné le promoteur de la TACE dans le vecteur d'expression pGL2 dans le but d'effectuer des essais luciférase afin d'étudier les mécanismes transcriptionnels régissant la régulation de la TACE. Nous avons démontré, grâce à cette technique, que l'hypoxie augmente l'activité du promoteur de la TACE via l'induction de la liaison du facteur de transcription HIF-1 à deux sites HRE contenus dans ce promoteur. D'un autre côté, même si l'induction régie par le $\text{TNF}\alpha$ requiert en partie la présence du HIF-1, elle est principalement dépendante du facteur de transcription $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Finalement, nous avons vérifié l'effet de l'anti-inflammatoire dexaméthasone, souvent utilisé pour traiter la PR, au niveau de la régulation de la TACE et nous avons découvert que ce glucocorticoïde a un effet inhibiteur sur l'activité du promoteur de la TACE.

Ces résultats indiquent que l'hypoxie et le $\text{TNF}\alpha$, deux conditions présentes chez les articulations arthritiques, sont impliqués dans la régulation à la hausse de la TACE et, par conséquent, augmentent la disponibilité du $\text{TNF}\alpha$ soluble, une cytokine pro-inflammatoire importante dans l'amplification de la réponse inflammatoire.

Mots clés : TACE, hypoxie, $\text{TNF}\alpha$, polyarthrite rhumatoïde, inflammation

1- INTRODUCTION

1.1 Métalloprotéinases de la famille ADAM

1.1.1 Identification de la TACE

C'est à la fin du 18^e siècle qu'on situe habituellement l'origine de l'immunologie. À cette époque que le docteur Edward Jenner a expérimenté pour la première fois ce qui allait devenir la vaccination. Il a inoculé la variole des vaches à un garçon de huit ans, ce qui l'a immunisé contre la variole humaine. Par la suite, plusieurs avancées de grande importance ont contribué à la caractérisation du système immunitaire. En effet, vers la fin du 19^e siècle, l'immunologiste Élie Metchnikoff découvrit que plusieurs micro-organismes pouvaient être ingérés et détruits par des cellules phagocytaires qu'il a appelées macrophages. Il a établi que ces cellules constituent la première ligne de défense de l'hôte contre un envahisseur. En 1975, l'équipe de Carswell a démontré que les macrophages sécrètent une substance baptisée *tumor necrosis factor* (TNF) capable de lyser des cellules tumorales (Carswell et al., 1975). Cette cytokine est une glycoprotéine transmembranaire de type II de 26 kDa qui peut aussi exister sous une forme soluble de 17 kDa suite à un clivage protéolytique entre les résidus alanine⁷⁶ et valine⁷⁷ (Jue et al., 1990; Kriegler et al., 1988). Deux groupes de chercheurs indépendants, l'un dirigé par Marcia L. Moss et l'autre par Roy A. Black, ont isolé, identifié et caractérisé en 1997 l'enzyme responsable de ce clivage (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Il s'agit de la TACE (*TNF alpha converting enzyme*), ou ADAM 17, dont l'acronyme reflète bien le rôle physiologique qui a permis son identification, soit la conversion du TNF α transmembranaire en TNF α soluble. Par la suite, plusieurs autres substrats, qui seront décrits plus loin, ont été identifiés. Le gène encodant la TACE, d'environ 50 kb et comprenant 19 exons, se situe sur le chromosome humain 2p25 (Cerretti,

1999). Cette protéine a une expression ubiquiste et est exprimée par plusieurs types cellulaires (discutés plus loin).

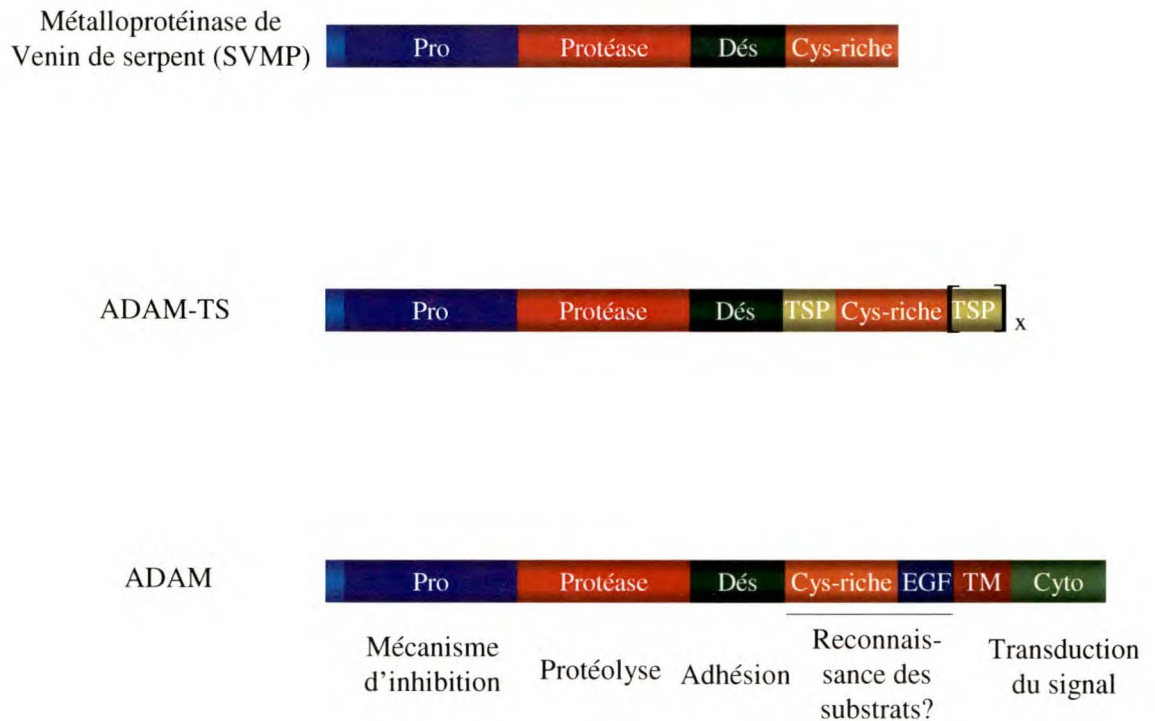
1.1.2 Origine et structure de la famille d'enzymes ADAM

La TACE fait partie de la famille d'enzymes ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*), aussi appelée MDC (*metalloprotease disintegrin with cysteine-rich domains*), qui fait partie de la superfamille de métalloprotéinases metzincin dépendantes du zinc (Schlondorff et Blobel, 1999). Le nom ADAM fait référence aux deux domaines (domaines désintégrine et métalloprotéinase) présents chez tous les membres de cette famille et que l'on retrouve aussi chez les SVMP (*snake venom metalloproteases*) de classe III, une classe d'enzymes de la superfamille des métalloprotéinases metzincin, étroitement apparentée aux ADAM, de même que les ADAM-TS (Bridges et Bowditch, 2005). Ce nom est aussi représentatif de l'origine de ces enzymes. Les membres fondateurs de cette famille, fertiline α (ADAM 1) et fertiline β (ADAM 2), sont impliqués lors des premiers événements de la reproduction, c'est-à-dire au niveau de la fusion entre le spermatozoïde et l'ovule, d'où le nom de fertiline (Blobel et al., 1992). Cette famille d'enzymes a donc été baptisée par analogie à Adam, la création de Dieu à la tête de la Genèse. Aujourd'hui, cette famille contient près de 40 membres identifiés chez une variété d'espèces, dont 23 chez l'humain, ainsi que chez d'autres eucaryotes tels que *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* et *Xenopus* (Bridges et Bowditch, 2005). Cependant, le rôle physiologique de certains d'entre eux reste à découvrir.

Les ADAM sont des glycoprotéines transmembranaires de type I, d'une longueur d'environ 750 acides aminés et composées de plusieurs domaines tel qu'on peut le voir à la figure 1

(Primakoff et Myles, 2000). En N-terminal, on retrouve un peptide signal, nécessaire à l'entrée des ADAM dans la voie de sécrétion de la cellule, et un pro-domaine, suivi par les domaines métalloprotéinase et désintégrine ainsi que d'une région riche en cystéines qui contient habituellement une répétition EGF. Finalement, le domaine transmembranaire et la queue cytoplasmique se situent en C-terminal. Tous ces domaines, à l'exception du domaine transmembranaire, semblent avoir un rôle fonctionnel, et non seulement structural, chez au moins une ADAM.

Les ADAM sont synthétisées sous forme de zymogènes. Le pro-domaine, en N-terminal, garde l'enzyme dans une conformation inactive via un mécanisme de commutation (Van Wart et Birkedal-Hansen, 1990). Le groupe sulfhydryl du résidu cystéine libre de la séquence PKVCGVDP, présente dans le pro-domaine, interagit avec l'atome de zinc du site catalytique, inhibant ainsi l'activité enzymatique. L'abolition de cette interaction, qui a lieu au niveau du trans-Golgi, est donc nécessaire pour la maturation et l'activité protéase des ADAM (Milla et al., 1999). Le clivage du pro-domaine d'une enzyme par les convertases de proprotéines est un phénomène prédominant pour l'activation de plusieurs métalloprotéinases. Certaines ADAM, dont les ADAM 9, 10, 12, 15 et 17 (Anders et al., 2001; Endres et al., 2003; Loechel et al., 1998; Lum et al., 1998; Peiretti et al., 2003), contiennent dans leur pro-domaine une séquence de clivage consensus RXXR pour la furine, une convertase de proprotéines. Il a été démontré au laboratoire que la maturation de la TACE (ADAM 17) est régulée, entre autres, par cette enzyme au site de clivage RVKR situé à la jonction entre le pro-domaine et le domaine catalytique de la TACE, tel qu'illustré à la figure 2 (Srouf et al., 2003). Chez les cellules LoVo, une lignée cellulaire d'adénocarcinome de colon humain, une mutation ponctuelle est présente sur chacun des allèles encodant le



Adapté de Moss et al, 2001 et de Seals et Courtneidge, 2003

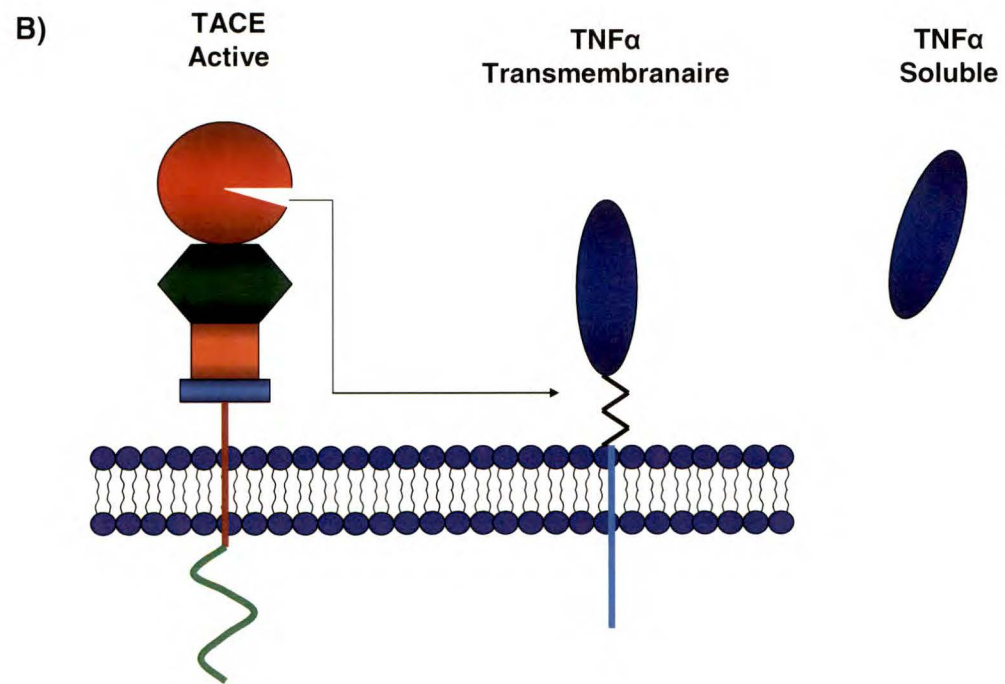
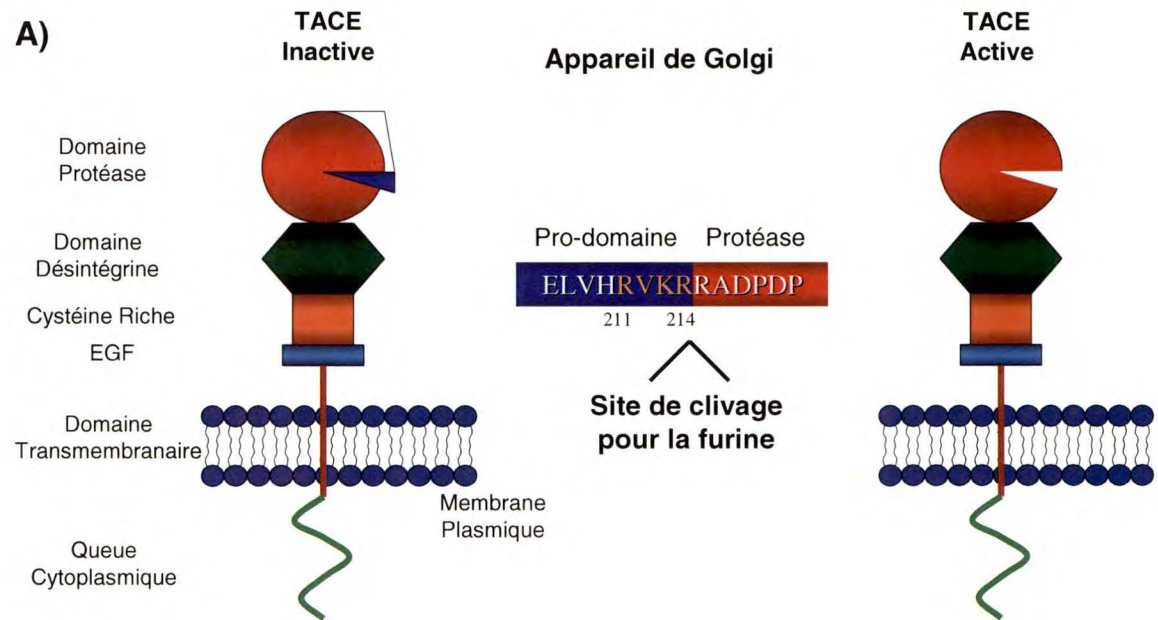
Figure 1 : Structure des principales familles d'enzymes de la superfamille de métalloprotéinases metzincin dépendantes du zinc. Les différents domaines composant les membres de trois familles d'enzymes ainsi que la fonction principale de ces domaines sont représentés selon un code de couleur. Le pro-domaine (Pro) est essentiel au maintien de l'enzyme dans une conformation inactive. Le domaine métalloprotéinase (Protéase) est impliqué dans la protéolyse des substrats tandis que le domaine désintégrine (Dés) est responsable de l'adhésion cellulaire. Finalement, on retrouve le domaine riche en cystéine (Cys-riche) ainsi que la répétition EGF (EGF), possiblement impliqués dans la reconnaissance des substrats, et, uniquement chez les ADAM, la queue cytoplasmique (Cyto), précédée du domaine transmembranaire (TM), qui transmet le signal intracellulaire. Seules les ADAM-TS possèdent un nombre variable de répétitions thrombospondine (TSP).

domaine P de la furine, résultant en une inhibition complète de l'activité de cette convertase. On observe chez ces cellules une inhibition de 50 % de la maturation de la TACE. La complémentation des LoVo avec de la furine exogène restaure une maturation complète de la TACE. De plus, le decanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CH₂Cl, un inhibiteur peptidique des convertases de proprotéines, entraîne une réduction de la maturation de la TACE et ce tant chez les LoVo complémentées avec de la furine que chez les LoVo de type sauvage, ce qui suggère l'implication de certaines autres convertases de proprotéines. Au laboratoire, il a été démontré que la PC1, la PACE4 ainsi que la PC5/PC6 pouvaient elles aussi maturer la TACE soit *in vitro* ou *in vivo*. En plus de son rôle d'inhibiteur de l'activité protéase, le pro-domaine est aussi important pour le transport intracellulaire de certaines ADAM. Par exemple, la surexpression de l'ADAM 12 sans le pro-domaine chez des cellules COS-7 résulte en l'accumulation de cette enzyme au niveau du réticulum endoplasmique, donc en une inhibition de la translocation vers l'appareil de Golgi (Loechel et al., 1999).

Pendant le développement et la vie adulte, les cellules ont la capacité de modifier leur surface afin de réguler plusieurs fonctions (Primakoff et Myles, 2000). Par exemple, le domaine extracellulaire de nombreuses protéines transmembranaires est clivé et relâché par une variété de protéases, dont les ADAM. Tous les membres de cette famille d'enzymes contiennent un domaine métalloprotéinase. Cependant, seulement 17 des 23 ADAM humaines présentent une séquence de liaison au zinc au niveau de ce domaine (White, 2003). Les trois résidus histidine (H) de cette séquence, HEXXHXXGXXH, se lient à l'atome de zinc et le résidu d'acide glutamique (G) promouvoit l'activité catalytique en positionnant une molécule d'eau qui attaque le squelette peptidique du substrat. Jusqu'à maintenant, toutes les enzymes testées (7) possèdent une activité protéase, ce qui laisse supposer que les

Figure 2 : A) Maturation de la TACE. La TACE est synthétisée initialement sous une forme zymogène, gardée dans une conformation inactive par le pro-domaine. Un site de clivage pour la furine, arginine (R), valine (V), lysine (K) et arginine (R), se situe à la jonction entre le pro-domaine (en bleu) et le domaine métalloprotéinase (en rouge). Dans le compartiment tardif de l'appareil de Golgi, la furine clive la TACE en C-terminal de cette séquence, relâchant ainsi le pro-domaine. La TACE se retrouve donc dans une conformation active.

B) Exemple de l'activité protéolytique de la TACE. La TACE, lorsqu'elle est activée suite au clivage du pro-domaine, clive le TNF α transmembranaire de 26 kDa entre les résidus alanine⁷⁶ et valine⁷⁷ situés dans le domaine extra-cellulaire de cette cytokine. Cette activité protéolytique génère la forme soluble du TNF α de 17 kDa.



Adapté de Schlöndorff et Blobel, 1999

autres membres possèdent aussi cette activité. L'ADAM dont l'activité enzymatique est la mieux documentée est la TACE. L'activité métalloprotéinase de ces enzymes ainsi que leurs substrats seront expliqués dans une section ultérieure.

Les ADAM sont uniques parmi les protéines de la surface membranaire puisqu'elles possèdent un domaine désintégrine. La séquence de ce domaine a une homologie importante avec celle des SVMP (Bridges et Bowditch, 2005). Ces dernières sont des ligands des intégrines bien connus, ce qui laisse présager que les ADAM pourraient elles aussi se lier à certaines intégrines. Au fait, il a été répertorié que plusieurs ADAM humaines peuvent interagir avec une variété d'intégrines, dont les ADAM 1, 2, 7, 9, 12, 15, 23, 28 et 33 (Almeida et al., 1995; Bigler et al., 2000; Bridges et al., 2002; Cal et al., 2000; Eto et al., 2002; Eto et al., 2000; Nath et al., 1999; Tomczuk et al., 2003; Zhou et al., 2001). La présence de domaines métalloprotéinase et désintégrine à l'intérieur de la même protéine est quelque peu contradictoire étant donné leur fonction respective (clivage et adhésion). Un modèle d'interaction suggéré pour la TACE peut aider à réconcilier ces deux fonctions. Dans ce modèle, la TACE utilise son domaine désintégrine pour se lier au substrat, ou à une protéine associée à ce substrat, pour ensuite le cliver via son domaine métalloprotéinase (Primakoff et Myles, 2000). Cependant, ce modèle n'a pas encore été confirmé pour la TACE ni aucune autre ADAM.

Très peu d'informations sont disponibles concernant la région riche en cystéines ainsi que la répétition EGF. Le rôle le mieux documenté de ce domaine est la liaison aux syndécans, qui a été démontré pour la première fois pour l'ADAM 12, ce qui permet l'adhésion cellulaire (Iba et al., 2000). Pour ce qui est de la TACE, aucune fonction n'a été attribuée à son

domaine riche en cystéines. Il est possible qu'il soit important pour la reconnaissance des substrats ou pour la maturation de la TACE mais ceci reste à vérifier (Milla et al., 1999; Reddy et al., 2000).

Finalement, plusieurs évidences suggèrent que la queue cytoplasmique des ADAM est impliquée 1- au niveau de la transduction du signal vers l'intérieur ou vers l'extérieur de la cellule, 2- au niveau du contrôle de la maturation et de la localisation cellulaire des ADAM et 3- au niveau de l'activité de clivage (Abram et al., 2003; Cousin et al., 2000). Ces fonctions sont régulées par des modifications de la queue cytoplasmique telles que la phosphorylation ou la liaison à des protéines contenant un domaine SH3 (*Src Homology*) (Diaz-Rodriguez et al., 2002; Howard et al., 1999; Kang et al., 2000; Soond et al., 2005; Weskamp et al., 1996). Par exemple, la phosphorylation de la queue cytoplasmique de l'ADAM 9 par la protéine kinase C aide au recrutement de l'enzyme à des sites spécifiques de la membrane plasmique ce qui induit le clivage de son substrat pro-HB-EGF (*pro-heparin-binding-epidermal growth factor*) (Izumi et al., 1998). Une interaction a aussi été identifiée entre la TACE et la protéine MAD2 impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire (Nelson et al., 1999). Cette association suggère un rôle soit pour la TACE au niveau de la modulation de certains aspects du cycle de la cellule, soit pour le MAD2 dans la régulation des fonctions de la TACE de façon dépendante du cycle cellulaire.

1.1.3 Localisation cellulaire et tissulaire des ADAM

L'expression tissulaire des ADAM varie considérablement entre les différents membres de cette famille. Le tableau I démontre bien que, des 23 ADAM humaines, près de la moitié sont localisées exclusivement ou principalement au niveau des testicules ou des structures

Tableau I : Localisation tissulaire des ADAM humaines

ADAM	Autre noms	Localisation tissulaire	Références
1	Fertiline alpha, PH-30 alpha	Testicules	(Kim et al., 2003)
2	Fertiline beta, PH-30 beta	Testicules	(Gupta et al., 1996)
3	Cyritestin, tMDC I	Testicules	(Choi et al., 2003)
6	tMDC IV	Testicules	(Frayne et al., 1997)
7	EAP-1	Épididyme	(Lin et al., 2001)
8	MS2, CD156	Granulocytes, Monocytes	(Yoshiyama et al., 1997)
9	meltrin gamma, MDC 9	Somatique	(Weskamp et al., 1996)
10	Kuz, MADM, SUP-17	Somatique	(Chantry et Glynn, 1990)
11	MDC	Cerveau	(Sagane et al., 1998)
12	meltrin alpha	Somatique	(Gilpin et al., 1998)
15	metargidin, MDC15	Somatique	(Kratzschmar et al., 1996)
17	TACE	Somatique	(Black et al., 1997)
18	tMDC III	Testicules	(Frayne et al., 2002)
19	meltrin beta, MADDAM	Somatique	(Kurisaki et al., 1998)
20		Testicules	(Poindexter et al., 1999)
21		Testicules	(Poindexter et al., 1999)
22	MDC2	Cerveau	(Harada et al., 2000)
23	MDC3	Cerveau	(Cal et al., 2000)
28	MDC-Lm, MDC-Ls, sMDC II	Épididyme, Poumon, Lymphocytes	(Roberts et al., 1999)
29		Testicules	(Xu et al., 1999)
30		Testicules	(Cerretti et al., 1999)
32		Testicules	(Choi et al., 2003)
33		Somatique	(Yoshinaka et al., 2002)

Adapté de Seals et Courtneidge, 2003

associées (l'épididyme par exemple). Cette distribution reflète bien l'importance de certaines ADAM, notamment ADAM 1 et 2, dans les processus de spermatogenèse et de fertilisation (Blobel et al., 1992; Primakoff et al., 1987). Les autres ADAM sont exprimées chez une variété de tissus somatiques, dont le type et le nombre diffèrent dépendamment de l'ADAM en question.

Les ADAM 11, 22 et 23, par exemple, se retrouvent majoritairement au cerveau, ce qui suggère leur implication au niveau de la neurogenèse, tandis que les ADAM 8 et 28, principalement exprimées par les granulocytes, monocytes et lymphocytes (composantes importantes du système immunitaire) seraient impliquées dans des fonctions immunologiques (Mezyk et al., 2003). D'autres ADAM, telles que ADAM 9, 12 et 19, ont d'abord été isolées à partir de cellules myoblastes, mais il a été démontré par la suite qu'elles sont présentes dans plusieurs tissus tels que le cœur, le cerveau, le placenta, les poumons, les reins, le pancréas et la rate (Inoue et al., 1998; Yagami-Hiromasa et al., 1995). De façon analogue, la TACE a une expression ubiquiste (Yamamoto et al., 1999). Elle est exprimée chez plusieurs types cellulaires dont les monocytes, macrophages, lymphocytes T, neutrophiles, cellules endothéliales, cellules musculaires lisses et myocytes. Les plus hauts niveaux d'expression se retrouvent, pour ce qui est de l'adulte, dans le cœur, le placenta, les muscles squelettiques, le pancréas, la rate, le thymus, la prostate, les testicules, les ovaires et le petit intestin (Black et al., 1997). On note aussi une expression faible, mais significative, au niveau du cerveau, des poumons et du foie. Pour ce qui est du fœtus, le cerveau, les poumons, le foie et les reins présentent tous de fortes expressions de la TACE. Ces différents patrons de distribution laissent supposer que les fonctions de la TACE diffèrent selon le stade de développement de l'organisme. La présence de cette enzyme dans un si

grand nombre de tissus suggère une implication au niveau de plusieurs phénomènes physiologiques et pathologiques tels que l'implantation de l'embryon, l'ostéogenèse, la réponse inflammatoire ainsi que la maladie de Crohn, l'Alzheimer et la polyarthrite rhumatoïde que nous verrons plus loin.

Plusieurs évidences démontrent que les ADAM sont synthétisées à l'intérieur du réticulum endoplasmique rugueux et transportées ensuite dans l'appareil de Golgi tardif où elles sont maturées par le clivage du pro-domaine (Hougaard et al., 2000; Howard et al., 2000; Kang et al., 2002; Lum et al., 1998; Roghani et al., 1999; Schlondorff et al., 2000). Par contre, la localisation cellulaire de la protéine mature où s'effectue la reconnaissance et le clivage des substrats est encore controversée. Il semble que la majorité des ADAM matures se situe près du noyau de la cellule et, dans certains cas, cette expression co-localise avec des marqueurs du Golgi (Lammich et al., 1999; Shirakabe et al., 2001). Les ADAM peuvent aussi être détectées à la surface cellulaire (Black et al., 1997; Roghani et al., 1999). Il semble que, dans certains cas, ce soit la structure de la protéine qui détermine sa localisation cellulaire. Toutes les ADAM ont au moins une isoforme composée du domaine transmembranaire suivi de la queue cytoplasmique. Cependant, certaines ADAM existent sous différentes formes, sans domaine transmembranaire ou queue cytoplasmique, résultantes de l'épissage alternatif. Par exemple, la forme courte de l'ADAM 12 (ADAM 12-S), sans queue cytoplasmique, transite via la voie de sécrétion et est sécrétée par la cellule tandis que la forme longue et inactive (ADAM 12-L) est retenue dans le *trans*-Golgi (Hougaard et al., 2000).

Certains membres de la famille ADAM peuvent être actifs à l'intérieur de la cellule. Par exemple, la majorité de la forme mature de l'ADAM 15 est résistante à la trypsination, ce

qui indique une localisation principalement intracellulaire (Howard et al., 2000; Lum et al., 1998). L'ADAM 15 pourrait donc agir en tant que métalloprotéinase dans la voie de sécrétion de la cellule et ainsi cliver des substrats intracellulaires. Par contre, ceci n'exclut pas un rôle protéolytique ou d'adhésion cellulaire qui serait effectué par l'expression minoritaire de l'ADAM 15 à la surface de la cellule. La fonction exacte de l'ADAM 15 intracellulaire, ainsi que celle de l'ADAM 15 exprimée à la surface cellulaire, demeure cependant à clarifier. La TACE est une des rares ADAM à avoir un rôle physiologique connu pour son expression intra et extracellulaire. Il a été établi par le groupe de Schlöndorff que la TACE a une localisation principalement périnucléaire avec une expression faible, mais significative, au réticulum endoplasmique et à la surface cellulaire (Schlondorff et al., 2000). Cette dernière est impliquée dans le clivage et le relâchement de la forme soluble d'une grande variété de substrats (discuté plus loin). Skovronsky et ses collègues ont démontré, quant à eux, que la TACE intracellulaire est responsable du clivage de la protéine précurseur amyloïde β qui prévient la formation des plaques d'Alzheimer (discuté plus loin) (Skovronsky et al., 2000).

1.1.4 Spécificité de maturation des substrats des ADAM

Le rôle des ADAM le mieux documenté est leur activité métalloprotéinase. Par contre, les mécanismes de reconnaissance des substrats des ADAM demeurent un mystère puisque très peu d'éléments sont disponibles à ce sujet. Cependant, certaines évidences aident à dresser quelques hypothèses. Tel que mentionné plus haut, la structure de l'enzyme est importante pour son activité protéolytique. En effet, le clivage du pro-domaine est essentiel à l'activation des ADAM (Milla et al., 1999). De plus, la localisation cellulaire de l'enzyme

influence son activité soit vers des substrats intra ou extracellulaires. La présence de la queue cytoplasmique ainsi que sa forme, phosphorylée ou associée à d'autres protéines, a un impact sur la localisation de l'enzyme et donc sur son activité de clivage, tel que discuté précédemment (Seals et Courtneidge, 2003).

L'ADAM dont l'activité métalloprotéinase est la plus étudiée est la TACE. Cette enzyme possède une très grande variété de substrats. Le clivage du TNF α transmembranaire pour générer la forme soluble et active de cette cytokine est le premier rôle physiologique qui a permis l'identification de la TACE (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Par la suite, l'analyse de souris déficientes en TACE active (TACE $^{\Delta Zn/\Delta Zn}$) a permis l'identification de plusieurs autres substrats. Ces souris ne possèdent pas la séquence de liaison au zinc normalement présente dans le domaine catalytique de la TACE et essentielle à son activité enzymatique (Peschon et al., 1998). La majorité de ces souris meurent entre le jour embryonnaire 17,5 et le jour de la naissance en raison de nombreuses anomalies au niveau du développement de la peau, des muscles, des poumons, du système neuronal et probablement d'autres tissus et organes (Zhao et al., 2001). Les embryons et les rares souris qui survivent quelques jours à la naissance présentent un phénotype similaire aux souris déficientes en TGF α , soit l'absence du sac conjonctival et de la fusion des paupières de même que la présence de cornées très minces et d'anomalités sévères au niveau de la peau et des cheveux (Luetke et al., 1993). Donc, ces observations identifient le TGF α en tant que substrat de la TACE. De plus, l'analyse des thymocytes et cellules myéloïdes des souris TACE $^{\Delta Zn/\Delta Zn}$ suggère que la TACE est impliquée dans le clivage du récepteur au TNF α (p75 TNFR) et de la L-sélectine (Peschon et al., 1998). Finalement, des études à partir des

fibroblastes embryonnaires de ces souris ont révélé que la TACE est responsable du clivage α de la protéine précurseur amyloïde (APP) (Buxbaum et al., 1998). Ensuite, d'autres cytokines, récepteurs à cytokines, molécules d'adhésion et autres se sont ajoutés à la liste de substrats de la TACE grâce à des essais *in vivo* et *in vitro*. Ils peuvent être arbitrairement classifiés en deux groupes : 1) ceux impliqués dans le développement et la différenciation et 2) ceux impliqués dans la réponse immunitaire (tableau III) (Mezyk et al., 2003). Les rôles physiologiques et pathologiques de ces substrats seront discutés dans une section ultérieure.

La grande diversité des substrats de la TACE amène plusieurs chercheurs à se questionner au sujet des mécanismes contrôlant la reconnaissance de cette enzyme à ses substrats. Il ne semble pas y avoir de séquence de reconnaissance consensus pour la TACE puisque la séquence du site de clivage diffère d'un substrat à l'autre et il n'y a pas de similarité dans la séquence d'acides aminés qui entourent ce site de clivage (Mezyk et al., 2003). De plus, plusieurs études ont établi que des mutations dans la séquence peptidique primaire, entourant le site de clivage, n'ont aucun effet sur l'activité protéolytique de la TACE sur certains substrats tels que le TGF α , la L-sélectine et le récepteur à l'interleukine-6 (IL-6R) (Althoff et al., 2000; Arribas et al., 1997; Migaki et al., 1995; Mullberg et al., 1994). Par contre, il a été démontré que la longueur de la séquence séparant le premier domaine extracellulaire du substrat de la membrane plasmique est importante puisque la délétion de plus de 10 acides aminés de cette séquence du pro-TNF α inhibe le relâchement de sa forme soluble (Tang et al., 1996). Des essais de cinétiques *in vitro* ont démontré que la TACE recombinante pouvait cliver un peptide synthétique encodant le site de clivage du TNF α mais pas celui du

TNFR1 ou celui de l'IL-6R (Mohan et al., 2002). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que certains de ces peptides ne sont pas présentés à l'enzyme de la même façon que lorsqu'ils sont à l'intérieur de la cellule. Tous ces résultats suggèrent donc que la TACE nécessite une séquence d'acides aminés de seulement 8 à 10 résidus et que la forme des substrats et de la TACE (transmembranaire versus soluble) est plus importante que la séquence peptidique primaire entourant le site de clivage. Par exemple, la TACE et le TNFR2 doivent tous deux être liés à la membrane pour un clivage efficace de ce dernier.

D'autres ADAM ont une activité métalloprotéinase importante. L'ADAM 10 a été purifiée pour la première fois à partir d'un cerveau bovin et reconnue pour cliver la protéine myéline basique (Howard et Glynn, 1995). Plusieurs autres substrats ont été identifiés suite à des analyses génétiques tels que le pro-HB-EGF, le collagène de type IV, le TNF α transmembranaire ainsi que la protéine Notch (Lemjabbar et Basbaum, 2002; Lunn et al., 1997; Millichip et al., 1998; Qi et al., 1999). L'ADAM 9, quant à elle, est reconnue principalement pour être impliquée dans le clivage du pro-HB-EGF mais elle peut aussi cliver des substrats de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine et la gélatine (Izumi et al., 1998; Schwettmann et Tschesche, 2001) tandis que l'ADAM 12 a seulement deux substrats connus soit le pro-HB-EGF et le IGFBP-3 (*insulin-like growth factor-binding protein 3*) (Asakura et al., 2002; Shi et al., 2000). Les mécanismes de reconnaissance de ces différents substrats demeurent encore inconnus. Le tableau II, énumérant les principaux substrats de ces ADAM, montre qu'il existe de la redondance au niveau des substrats et des fonctions de ces enzymes.

Tableau II : Liste des principaux substrats et fonctions des principales ADAM humaines ayant une activité métalloprotéinase connue

Protéines	Principaux substrats	Fonctions
ADAM 9	pro-HB-EGF, fibronectine, gélatine	myogenèse, ostéogenèse
ADAM 10	pro-HB-EGF, pro-TNF α , Notch, collagène de type IV	neurogenèse
ADAM 12	pro-HB-EGF, IGFBP-3	myogenèse, ostéogenèse
ADAM 17 (TACE)	pro-TNF α , pro-TGF- α , L-sélectine, TNFRI, TNFRII, Notch, APP	développement et différenciation, réponse immunitaire

Adapté de Mezyk et al, 2003 et de White, 2003

Tableau III : Classification fonctionnelle des substrats de la TACE

Développement et différenciation	Système immunitaire	Autres
pro-TGF α	pro-TNF α	protéine précurseure amyloïde
pro-HB-EGF	fractalkine	protéine cellulaire prion
pro-amphiréguline	L-sélectine	MUC1
TRANCE	Fas ligand	collagène de type IV
pro-neuréguline- α -2C	TNFR I	collagène de type XVII
Notch	TNFR II	
TrkA	CD30	
Erb-B4/HER4	IL-1RII	
GH-R	IL-6R	
	M-CSFR	

Adapté de Mezyk et al, 2003

1.1.5 Implications de la TACE lors de phénomènes physiologiques et pathologiques

Tel que mentionné précédemment, les souris déficientes pour la TACE meurent au stade embryonnaire à cause du développement anormal de plusieurs organes, ce qui indique la nécessité de cette ADAM dans le processus développemental. De plus, la vaste distribution de la TACE ainsi que son activité protéolytique sur une variété grandissante de substrats suggèrent une implication importante de cette enzyme au niveau de plusieurs phénomènes physiologiques et pathologiques (Tableau III) (Mezyk et al., 2003).

1.1.5.1 Développement et différenciation

Plusieurs molécules responsables du développement et de la différenciation cellulaire sont clivées par la TACE. Certains ligands des récepteurs de la famille du facteur de croissance épidermique (EGF : *epidermal growth factor*) sont impliqués dans la prolifération cellulaire via l'activation de leur récepteur. Ces ligands, synthétisés sous la forme transmembranaire, peuvent être relâchés sous une forme soluble suite au clivage par la TACE (Peschon et al., 1998). L'inhibition du clivage du TGF α a démontré que la forme soluble de ce facteur de croissance, contrairement à sa forme transmembranaire, est essentielle pour l'activation du récepteur EGF (Borrell-Pages et al., 2003). Ce phénomène met en évidence l'importance de la TACE pour l'activité biologique du TGF α . De façon analogue, par son action enzymatique sur la pro-amphiréguline, le pro-HB-EGF et la pro-neuréguline- α -2C, la TACE modifie le signal intracellulaire envoyé par les récepteurs EGF et, par conséquence, la prolifération cellulaire ainsi que le développement précoce du système nerveux central et cardiovasculaire (Merlos-Suarez et al., 2001; Montero et al., 2000; Sunnarborg et al., 2002).

En plus du clivage de ces molécules, la TACE est responsable du relâchement du domaine extracellulaire de certains récepteurs pour les facteurs de croissance. La relâche protéolytique du GH-R (*growth hormone receptor*), du récepteur Erb-B4/HER4 ainsi que du TrkA (*nerve growth factor receptor*) modifie également la réponse cellulaire et le développement de l'organisme (Diaz-Rodriguez et al., 1999; Rio et al., 2000; Zhang et al., 2000). Finalement, le clivage des protéines Notch et TRANCE par la TACE influence respectivement la différenciation cellulaire et l'ostéoclastogenèse (Brou et al., 2000; Lum et al., 1999).

1.1.5.2 Système immunitaire

La TACE participe aussi au clivage de plusieurs protéines jouant un rôle au niveau du système immunitaire dont des cytokines, des récepteurs à cytokines et des molécules d'adhésion. L'un des substrats les mieux caractérisés de la TACE est le TNF α . Cette cytokine pro-inflammatoire existe sous deux formes, transmembranaire ou soluble. Ces deux formes possèdent une activité biologique importante quoique différente l'une de l'autre, tel qu'il sera discuté plus loin (Mueller et al., 1999). Le relâchement du TNF α soluble par la TACE permet la stimulation paracrine des cellules avoisinantes, et par conséquent l'induction des effets systémiques de cette cytokine. Pour sa part, le TNF α transmembranaire induit des effets locaux via une stimulation autocrine de la cellule. La TACE peut aussi moduler les activités du TNF α par la régulation du clivage des deux récepteurs du TNF α , soit le TNFRI et le TNFRII (Peschon et al., 1998; Solomon et al., 1999). En effet, une concentration croissante de ces récepteurs solubles dans le plasma sanguin peut diminuer les effets systémiques de cette cytokine en formant un complexe

soluble TNFR:TNF α empêchant le TNF α de lier ses récepteurs transmembranaires et ainsi induire une signalisation (Aderka, 1996; McDermott et al., 1999).

De façon analogue, le récepteur à l'interleukine 1 de type II soluble, IL-1RII, généré par la TACE, est un excellent antagoniste de l'IL-1, limitant ainsi son activité pro-inflammatoire (Symons et al., 1995). Par ailleurs, lorsque la TACE clive la chaîne alpha du récepteur à l'IL-6, cette dernière forme un complexe avec l'IL-6 qui peut lier la chaîne gp130, commune à plusieurs récepteurs de cytokines, et ainsi activer un plus grand nombre de cellules (Althoff et al., 2000; Modur et al., 1997; Romano et al., 1997). La L-sélectine est une autre protéine clivée par la TACE et impliquée dans le système immunitaire (Peschon et al., 1998). Cette glycoprotéine, exprimée par la majorité des leucocytes, régule l'attachement de ces cellules aux veinules post-capillaires des organes lymphoïdes (Stamenkovic, 1995). Le clivage de cette molécule d'adhésion inhibe la migration des leucocytes aux sites d'inflammation et représente donc un mécanisme de protection par lequel l'organisme tente de diminuer les effets systémiques néfastes des leucocytes activés (Ferri et al., 2002). Finalement, lorsqu'elle est exprimée sous la forme transmembranaire, la fractalkine, présente à la surface des cellules endothéliales et des neurones, joue le rôle de molécule d'adhésion en interagissant avec son récepteur CX3CR1 sur les cellules T, les cellules NK, les monocytes et les microglies (Cotter et al., 2002; Cybulsky et Hegele, 2003). Lorsqu'elle est clivée par la TACE, la forme soluble de cette protéine agit en tant que chimioattractant pour les mêmes cellules (Garton et al., 2001; Tsou et al., 2001). Donc, la TACE, par son action sur divers substrats, peut induire ou diminuer l'inflammation dépendamment si l'organisme a besoin d'initier la réponse inflammatoire afin, par exemple, d'éliminer un pathogène, ou s'il veut l'arrêter afin de limiter les dommages que cette réponse pourrait causer à long terme.

1.1.5.3 Pathologies humaines

En plus de son implication dans les phénomènes physiologiques décrits ci-dessus, la TACE joue un rôle important au niveau du contrôle et de l'établissement de certaines pathologies. Par exemple, le développement de certaines maladies neurodégénératives, telles que l'encéphalopathie spongiforme bovine (maladie de la vache folle) et la maladie de Creutzfeld-Jakob chez l'humain, requiert la transformation anormale de la protéine cellulaire prion. Cette modification engendre la déposition cérébrale d'une protéine insoluble et résistante aux protéases qui endommage le cerveau des individus atteints. Afin de protéger l'organisme contre la formation de ces agrégats toxiques, la TACE clive la protéine cellulaire prion pour générer un produit appelé N1 et ainsi empêcher la transformation anormale de cette protéine ainsi que les dommages cérébraux (Vincent et al., 2001). De façon analogue, le clivage de la protéine précurseur amyloïde (APP) par la TACE prévient la formation de plaques dans le cortex cérébral (Buxbaum et al., 1998). En effet, cette protéine, lorsqu'elle est clivée par des sécrétases β et γ , se transforme en peptide amyloïde- β (A β) qui s'accumule dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Gandy et Petanceska, 2000). Il a été démontré *in vitro* que l'induction du clivage de l'APP dans son domaine A β par la TACE diminue la génération de peptides amyloïde- β (Skovronsky et al., 2000).

Tel que mentionné précédemment, la TACE peut modifier la réponse inflammatoire par son action sur certaines molécules, dont le TNF α , ce qui suggère un rôle important de cette enzyme dans l'établissement de certaines pathologies associées à l'inflammation telles que la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, la sclérose en plaques, certains cancers et la polyarthrite rhumatoïde (Moss et al., 2001). La production et l'importance du TGF α dans la

progression tumorale de même que la génération du TNF α soluble, une cytokine importante dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde, viennent appuyer le rôle de la TACE dans ces phénomènes pathologiques (Arend et Dayer, 1995; Borrell-Pages et al., 2003). De plus, le TGF α et le TNF α , deux molécules pro-angiogéniques produites par les cellules tumorales et les macrophages activés (que l'on retrouve au niveau des articulations arthritiques), aident à la croissance tumorale et à la destruction du cartilage articulaire par la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et la dégradation de la matrice extracellulaire (Beckner, 1999; Crowther et al., 2001; Sunderkotter et al., 1994).

1.1.6 Régulation de la TACE

Puisque la TACE est importante du point de vue physiologique et pathologique, il devient essentiel de bien comprendre les mécanismes régulant son expression. Lors de la découverte de cette enzyme en 1997, le groupe de Black a démontré des différences significatives quant à l'expression de l'ARN messager de la TACE chez différents tissus et chez des tissus à des stades de différenciation distincts (foetus versus adulte) (Black et al., 1997). Par contre, l'activation de monocytes par les lipopolysaccharides (LPS) n'induit aucun changement dans l'expression de la TACE à la surface cellulaire (Cerretti, 1999). Par la suite, il a été établi que le PMA (*4 β -phorbol 12-myristate 13-acetate*), le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance fibroblastique (FGF) ainsi que le sérum de fœtus bovin n'affectent aucunement l'expression de la TACE chez les cellules HeLa S3 (Fan et al., 2003). De plus, la quantité d'ARN messager de cette enzyme n'est pas modifiée chez des cellules endothéliales humaines en culture stimulées par l'interleukine-1 α (IL-1 α) (Imaizumi et al., 2000). De ces observations, les chercheurs ont postulé que la TACE n'est pas régulée au niveau transcriptionnel. Cependant, il a été découvert récemment que l'ARN messager de

la TACE est augmenté chez des cellules endothéliales murines et humaines stimulées respectivement avec du VEGF ou du TNF α , ce qui implique un mécanisme de régulation au niveau transcriptionnel (Bzowska et al., 2004; Majka et al., 2002). L'augmentation de la TACE a aussi été démontrée chez certaines pathologies. En effet, on note une surexpression de la TACE chez des tissus mammaires cancéreux comparativement aux tissus normaux (Fabre-Lafay et al., 2005; Lendeckel et al., 2005). De même, l'expression de l'ARN messager de cette protéase est beaucoup plus élevée au niveau des cartilages atteints de polyarthrite rhumatoïde que dans les cartilages sains (Patel et al., 1998).

La TACE constitue donc une cible d'intérêt pour le traitement de certaines pathologies, notamment la polyarthrite rhumatoïde. C'est pourquoi l'étude des inhibiteurs de cette enzyme, qu'ils soient endogènes ou chimiquement synthétisés, devient importante. Le seul inhibiteur physiologique connu de la TACE est le TIMP-3 (*tissue inhibitor of metalloproteases 3*) (Amour et al., 1998). Tel que son nom l'indique, cette molécule a d'abord été découverte pour son activité inhibitrice sur les MMP (*matrix metalloproteases*). Par la suite, l'effet inhibiteur du TIMP-3 sur la TACE a été découvert. Depuis quelques années, plusieurs efforts ont été faits afin développer des inhibiteurs chimiques de la TACE. Par exemple, le GW3333 est un inhibiteur puissant de la TACE et, lorsque administré oralement, il a une longue demi-vie chez les rats et les chiens (Moss et al., 2001). De plus, il a été démontré que l'administration de cet inhibiteur à des rats arthritiques diminue significativement les symptômes de l'arthrite que sont l'enflure des chevilles et la destruction de l'articulation (Conway et al., 2001). Donc, certains inhibiteurs chimiques de la TACE pourraient avoir un potentiel thérapeutique. Le groupe de Nixon a démontré que le composé chimique Ro327315 inhibe la TACE, avec un K_i de 3 nM, et le relâchement du

TNF α (IC₅₀ = 375 nM) chez des monocytes humains en culture et cet inhibiteur est présentement en phase I des essais cliniques (Moss et al., 2001).

1.2 Polyarthrite rhumatoïde

Parmi plus de cent formes d'arthrite diagnostiquées à ce jour, la polyarthrite rhumatoïde (PR) représente l'une des plus sévères. C'est une maladie inflammatoire dégénérative de l'ensemble du tissu conjonctif prédominant au niveau de la membrane synoviale. Elle est caractérisée par une inflammation de plusieurs (poly) articulations (arthrite) avec une prédilection pour les mains, les poignets, les genoux et les pieds. Elle peut cependant atteindre toutes les articulations excepté la colonne vertébrale dorsale, lombaire et les articulations sacro-iliaques. La PR, jadis appelée PCE (polyarthrite chronique évolutive) est une maladie autoimmune très fréquente ; selon la Société d'arthrite canadienne, elle affecte environ 1% de la population. Au Canada, cela représente environ 300 000 personnes atteintes de cette pathologie. Cette affection est à nette prédominance féminine puisqu'elle atteint trois fois plus de femmes que d'hommes et elle se révèle habituellement entre 25 et 50 ans. Dans 70 % des cas, cette maladie chronique se développe progressivement sur une période allant de quelques semaines à plusieurs mois mais il arrive à l'occasion que les symptômes se manifestent en quelques jours. Elle cause des dommages irréversibles aux articulations, notamment au niveau du cartilage, des os, des tendons et des ligaments. Dans les cas les plus sévères, elle peut agir de façon systémique et atteindre d'autres organes et structures tels que les yeux, les poumons et le cœur (Feldmann et al., 1996a; Harris, 1990; Krane et al., 1990). Ces dommages résultent en une mobilité réduite et une invalidité progressive chez la personne atteinte (Smith et Arnett, 1991).

1.2.1 Étiologie de la polyarthrite rhumatoïde

Malgré de nombreuses années de recherche, l'étiologie exacte de la PR n'est pas encore connue. Plusieurs évidences suggèrent une contribution génétique importante à la susceptibilité des individus à la PR. Le risque relatif de développer la pathologie est plus élevé chez les jumeaux monozygotes (de 12 à 62 fois) et les membres de la famille immédiate d'une personne atteinte (de 2 à 17 fois) que chez la population en général (Aho et al., 1986; Seldin et al., 1999; Silman et al., 1993; Wolfe et al., 1988). Cette prédisposition face à l'arthrite est fortement associée au locus HLA-DRB1 du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II (Gorman et Criswell, 2002; Moxley et Cohen, 2002). Ce gène est l'un des plus polymorphiques de génome humain. Les allèles associées à une grande susceptibilité à la PR comportent une séquence d'acides aminés (⁷⁰Q/KRRAA⁷⁴) mieux connue sous le nom d'épitope partagé (Dessen et al., 1997; Gregersen et al., 1987; Hiraiwa et al., 1990). Cette séquence est présente chez plus de 80 % des patients atteints de PR. La communauté scientifique croit que cette séquence permettrait la liaison du CMH de classe II à des peptides du soi, tels que le collagène de type II, initiant ainsi la réponse autoimmunitaire des cellules T et le développement de la PR.

Les facteurs génétiques comptent pour un pourcentage modéré (environ 30 %) à la susceptibilité à l'arthrite, ce qui laisse entendre que d'autres facteurs peuvent contribuer au déclenchement de la maladie (Spector et al., 1996). Les facteurs environnementaux, principalement les infections virales ou bactériennes, pourraient bien être impliqués dans l'étiologie de la PR. Bien qu'il soit connu que les virus et parois bactériennes peuvent induire certaines formes d'arthrite, le mécanisme permettant le développement de la PR par ces agents n'est pas encore très bien défini. Toutefois, il semble que la théorie de l'épitope

partagé puisse s'appliquer à l'induction de la PR par des micro-organismes (Perl, 1999). En effet, cette séquence est aussi présente chez certains agents infectieux tels que la glycoprotéine B du virus Epstein-Barr ainsi que la protéine DnaJ de la bactérie *Escherichia coli*. La présence d'un tel micro-organisme pourrait donc induire une réponse immunitaire chez l'hôte dirigée contre ces agents infectieux et, par la même occasion étant donné la réactivité croisée des cellules T, contre les molécules du soi HLA présentant le même épitope partagé.

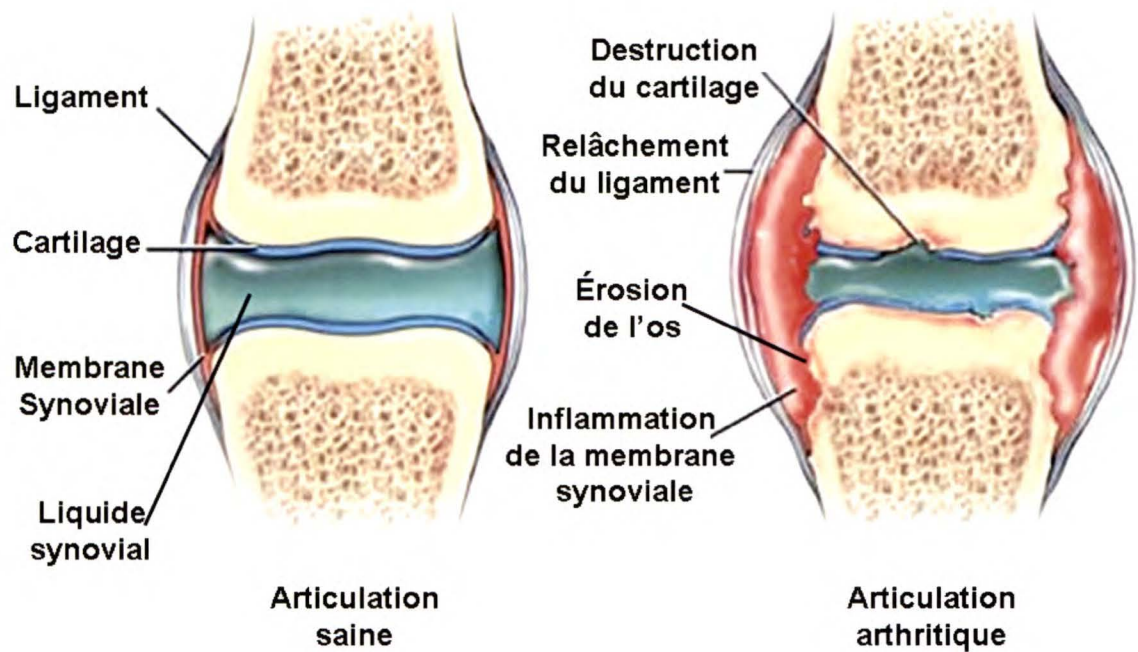
Bien sûr, certaines évidences proposent l'implication d'autres facteurs, dont les habitudes alimentaires, l'âge et les hormones sexuelles, dans le déclenchement de la PR. Par exemple, la prédominance de cette pathologie chez les femmes dans la période de pré-ménopause comparativement aux hommes du même âge, ainsi que l'effet protecteur de la pilule contraceptive et de la grossesse, suggèrent que les hormones sexuelles jouent un rôle dans le développement de la PR (Lahita, 1990). Cependant, aucun mécanisme valable n'a encore été proposé.

1.2.2 Développement de la pathologie

Afin de comprendre le développement de la PR, il est essentiel de connaître la physiologie d'une articulation saine. L'articulation est le point de rencontre d'au moins deux os, recouverts de cartilage à leur extrémité, ce qui permet à l'articulation d'effectuer une variété de mouvements avec une grande souplesse sans qu'il y est friction entre les os. Des muscles et des tendons retiennent le tout de façon solide tout en permettant un certain étirement. Entre les os se trouve la cavité articulaire qui est entièrement recouverte par la membrane synoviale productrice du liquide synovial, un lubrifiant important pour le mouvement de

l'articulation. La figure 3 illustre bien les principales composantes de l'articulation d'un genou humain.

La membrane synoviale est composée de seulement deux à trois couches de cellules qui, selon leur morphologie, l'expression de marqueurs à la surface cellulaire et leurs fonctions, peuvent être classées en deux types distincts (Barland et al., 1962; Wilkinson et al., 1992). Les synoviocytes de type A sont dérivés des monocytes de la moelle osseuse et possèdent une capacité phagocytaire et des vacuoles d'endocytose, ce qui confère à la membrane synoviale une fonction protectrice via l'élimination de débris articulaires ou de micro-organismes par ces cellules (Athanasou, 1995; Edwards et Willoughby, 1982). Ils sont aussi appelés synoviocytes de type macrophagiques. La morphologie des synoviocytes de type B s'apparente à celle des fibroblastes, c'est-à-dire d'apparence allongée en forme de fuseau (Firestein, 1996). Ces cellules possèdent un appareil de Golgi fonctionnel et peuvent donc sécréter différentes protéines dans leur environnement, notamment les protéoglycans, le collagène de type I, III, IV et V ainsi que l'acide hyaluronique, ce dernier augmentant la viscosité du liquide synovial (Zvaifler et Firestein, 1994). La membrane synoviale a aussi pour but de fournir l'oxygène et les nutriments, via le liquide synovial, aux cellules des structures adjacentes, telles que les chondrocytes du cartilage, car la faible vascularisation de ce milieu n'est pas suffisante (Firestein, 1996). Ainsi, la membrane synoviale joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie au sein de l'articulation. Cependant, dans le contexte de la PR, elle devient la source majeure des produits dérivés des mécanismes cellulaires déréglés et constitue la structure tissulaire à partir de laquelle l'invasion du cartilage a lieu.



Tiré du site internet <http://my.webmd.com>

Figure 3 : Illustration d'une coupe de l'articulation du genou humain sain comparé à un genou humain arthritique. L'articulation saine d'un genou est principalement composée de cartilage recouvrant les os, d'une membrane synoviale qui tapisse entièrement l'articulation ainsi que des ligaments qui retiennent le tout ensemble. De plus, le liquide synovial emplit l'espace compris entre les os (la cavité synoviale). Au niveau de l'articulation arthritique, on observe une inflammation de la membrane synoviale qui envahit l'articulation, menant à la destruction du cartilage, à l'érosion des os et au relâchement du ligament.

En effet, suite à l'activation de la réponse immunitaire par un agent inconnu, on assiste à l'hyperplasie de la membrane synoviale pouvant atteindre une épaisseur de dix couches cellulaires (Youssef et al., 1998). Une controverse subsiste encore quant à savoir si cet épaissement est dû à une prolifération cellulaire accrue ou à l'infiltration de cellules du système immunitaire. Il a été démontré que l'expression de marqueurs de prolifération est augmentée chez les fibroblastes synoviaux de tissus atteints de PR, ce qui suggère que l'accroissement de divisions cellulaires pourrait être en partie responsable de l'épaississement de la membrane synoviale (Qu et al., 1994). Cependant, le pourcentage de cellules présentant une activité proliférative est faible, ce qui laisse supposer que l'infiltration cellulaire serait principalement impliquée dans ce phénomène. Un marquage par immunohistochimie a révélé que les cellules de type macrophagique représentent 80 % des cellules infiltrantes (Youssef et al., 1998). De plus, on note la présence de plusieurs autres types cellulaires inflammatoires dont les cellules dendritiques, les cellules NK, les mastocytes, les lymphocytes B activés ainsi que les lymphocytes T (majoritairement de sous-type CD4⁺ Th1) (Kobayashi et Ziff, 1973; Kurosaka et Ziff, 1983; Takemura et al., 2001). Les neutrophiles, quant à eux, s'accumulent principalement dans le liquide synovial plutôt que dans le tissu synovial (Chatham et al., 1993).

L'infiltration cellulaire est principalement régie par un réseau de cytokines, chimiokines et de facteurs de croissance libérés par les synoviocytes (type A et B), les lymphocytes, les neutrophiles et même les chondrocytes du cartilage. Il a été démontré que les synoviocytes présentent des altérations phénotypiques, telles qu'une activité accrue des facteurs de transcription AP-1 et NF- κ B, impliquées dans l'augmentation de la production de ces

molécules (Fassbender et Gay, 1988). Parmi celles-ci, la cytokine pro-inflammatoire $\text{TNF}\alpha$ est une des plus importantes puisqu'elle est produite en grande quantité non seulement par les synoviocytes mais aussi par les lymphocytes, les cellules endothéliales et les chondrocytes (Arend et Dayer, 1995; Brennan et al., 1995). Elle se retrouve à la tête d'une cascade de production d'autres cytokines inflammatoires importantes telles que l'IL- 1β , l'IL-6 et le GM-CSF (Brennan et al., 1989). Ces molécules contribuent ensemble à activer la synovie qui devient progressivement un tissu agressif et destructeur, de l'apparence d'une tumeur, appelé le pannus (Zvaifler et al., 1997). Ce tissu est invasif et détruit le cartilage et les os. La production par les synoviocytes et les neutrophiles d'enzymes dégradant la matrice extracellulaire, notamment des métalloprotéinases et des enzymes protéolytiques, aide à cette invasion. En résumé, la PR se développe lorsqu'un agent inconnu active la réponse immunitaire entraînant l'infiltration de cellules inflammatoires, dont les lymphocytes T et B, occasionnant l'épaississement de la membrane synoviale et la formation du pannus qui va envahir et détruire l'articulation (figure 3).

1.2.3 Hypoxie

L'oxygène est essentiel à tous les organismes aérobiques. Toutefois, il arrive que l'apport de cette molécule aux tissus et aux cellules soit diminué, une condition physiologique caractérisant l'hypoxie. Plusieurs évidences suggèrent la présence de zones hypoxiques au niveau des articulations arthritiques. Tout d'abord, il a été établi que la tension d'oxygène présente aux articulations saines est plus faible que dans la majorité des autres tissus, principalement à cause de la rareté des vaisseaux sanguins fonctionnels (Mapp et al., 1995; Silver, 1975). Même si le nombre de vaisseaux sanguins est augmenté dans les articulations arthritiques (angiogenèse), cette nouvelle vasculature est moins bien organisée que dans les

autres tissus, ce qui perturbe la perfusion du tissu (FitzGerald et al., 1991; Neidhart et al., 1999). Puisque la membrane synoviale s'épaissit lors du développement de la PR, la distance entre les cellules de l'articulation et les vaisseaux sanguins augmente, rendant la diffusion de l'oxygène plus difficile. De plus, l'accroissement du liquide synovial entraîne une augmentation de la pression intra-articulaire, résultant en une compression des capillaires et donc une diminution de la perfusion (Richman et al., 1981). Ce phénomène se trouve même amplifié lors d'exercices physiques puisque la compression des vaisseaux sanguins est accrue en raison d'une pression intra-articulaire encore plus élevée (Jawed et al., 1997). On assiste donc à un apport d'oxygène inadéquat et insuffisant puisque la demande métabolique est vingt fois plus élevée dans les articulations arthritiques comparativement aux articulations saines en raison principalement de l'hyperplasie et de l'infiltration cellulaire de la membrane synoviale (Dingle et Thomas, 1956; Mapp et al., 1995). La présence d'hypoxie est aussi démontrée indirectement par le dosage des métabolites hypoxiques au niveau de la synovie. En effet, en condition anaérobie, les cellules vont produire l'ATP (énergie) via la glycolyse et il est connu depuis longtemps que les articulations arthritiques présentent de hauts niveaux de lactate, le produit final de la glycolyse (Naughton et al., 1993; Treuhaft et DJ, 1971). Récemment, le groupe de Peters a fourni une preuve directe, à l'aide d'un marquage immunohistochimique, de la présence de zones hypoxiques au niveau des articulations de rats atteints de PR (Peters et al., 2004). De plus, il a démontré que l'expression des facteurs de transcription HIF-1 et Ets-1 est induite chez les cellules composant le tissu articulaire de ces rats et qu'il existe une co-localisation de ces deux facteurs principalement chez les cellules inflammatoires infiltrantes et chez les cellules du pannus invasif formé à partir de la membrane synoviale.

1.2.3.1 Structure et activation du HIF-1

Le maintien de l'homéostasie de l'oxygène est donc essentiel au bon fonctionnement de l'organisme. C'est pourquoi, en condition hypoxique, celui-ci a développé une variété de mécanismes afin de rétablir une concentration physiologique d'O₂. Ces mécanismes sont régis par l'induction de plusieurs facteurs de transcription dont le ETS-1, le NF-κB et le facteur inductible à l'hypoxie (HIF-1) (Koong et al., 1994; Oikawa et al., 2001; Wang et al., 1995). Ce dernier est un médiateur clé de l'adaptation cellulaire et tissulaire à de faibles concentrations d'oxygène. L'importance du HIF-1 est illustrée par le nombre de gènes cibles ainsi que par son rôle dans l'embryogenèse. En effet, les embryons HIF-1/- présentent des malformations cardiovasculaires ainsi que des déficiences dans le développement neuronal et meurent au jour embryonnaire 10,5 (Kotch et al., 1999). Depuis sa découverte en 1992, en tant que facteur de transcription responsable de la régulation hypoxique du gène de l'érythropoïétine, plus de 70 gènes ciblés par le HIF-1 ont été identifiés (tableau IV) (Semenza et Wang, 1992). Ces gènes, et donc le HIF-1, sont impliqués dans différentes fonctions cellulaires telles que l'érythropoïèse, l'angiogenèse, l'homéostasie du fer, le métabolisme du glucose ainsi que la prolifération et la survie cellulaire (Semenza, 2003).

L'analyse structurale du HIF-1 indique que ce facteur de transcription est un hétérodimère composé de deux sous-unités, soit le HIF-1α de 120 kDa et le HIF-1β de 91 à 94 kDa (Wang et Semenza, 1995). Ce dernier, aussi appelé ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), est exprimé chez différents types cellulaires indépendamment de la concentration d'oxygène alors que le HIF-1α est virtuellement indétectable en condition

**Tableau IV : Liste des principaux gènes dont l'expression est régulée
par le facteur de transcription HIF-1**

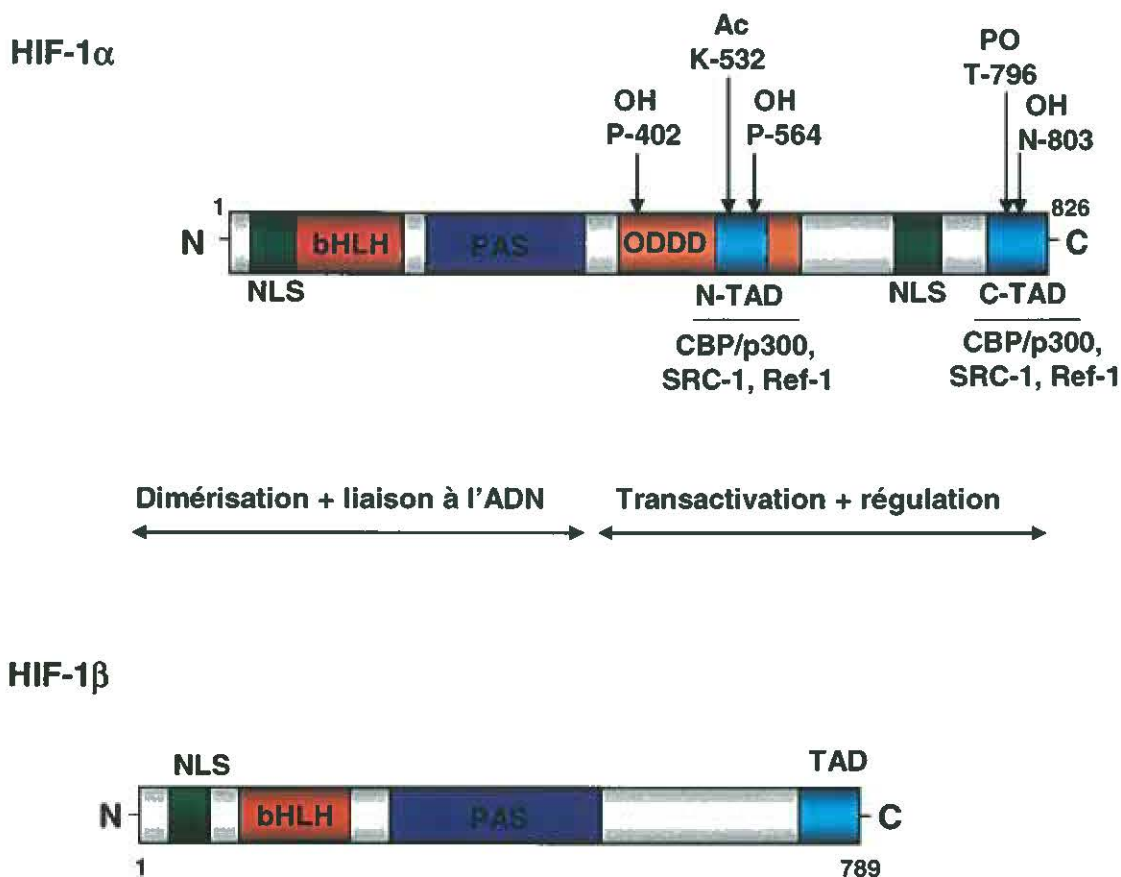
Gènes et fonctions	Références
Érythropoïèse et métabolisme du fer (transport de l'oxygène)	
Érythropoïétine	(Wang et Semenza, 1993)
Transferrine	(Rolfs et al., 1997)
Récepteur de la transferrine	(Lok et Ponka, 1999; Tacchini et al., 1999)
Céruloplasmine	(Mukhopadhyay et al., 2000)
Régulation vasculaire (transport de l'oxygène)	
VEGF	(Forsythe et al., 1996)
Flt-1 (récepteur VEGF)	(Gerber et al., 1997)
PAI-1	(Kietzmann et al., 1999)
iNOS	(Melillo et al., 1995)
Oxygénase hème 1	(Lee et al., 1997)
Adrénomedulline	(Nguyen et Claycomb, 1999)
Récepteur α_{1B} -adrénergique	(Eckhart et al., 1997)
Endothéline-1	(Minchenko et Caro, 2000)
Prise du glucose et glycolyse (énergie en anaérobie)	
Transporteur de glucose 1	(Ebert et al., 1995)
PFKFB3	(Minchenko et al., 2002)
Phosphofructokinase L	(Semenza et al., 1994)
Aldolase A	(Semenza et al., 1996)
Aldolase C	(Semenza et al., 1994)
GAPDH	(Graven et al., 1999)
Phosphoglycérate kinase 1	(Firth et al., 1994; Semenza et al., 1996)
Enolase 1	(Semenza et al., 1996; Semenza et al., 1994)
Lactate déshydrogénase A	(Firth et al., 1995)
Prolifération et survie cellulaire	
IGF-2	(Feldser et al., 1999)
IGF-BP1	(Tazuke et al., 1998)
IGF-BP2	(Feldser et al., 1999)
IGF-BP3	(Feldser et al., 1999)
TGF- α	(Krishnamachary et al., 2003)
NOS2	(Melillo et al., 1995)

Gènes et fonctions	Références
Apoptose	
Nucléophosmine	(Li et al., 2004)
NIP3	(Bruick, 2000; Sowter et al., 2001)
NIX	(Sowter et al., 2001)
Métabolisme de la matrice extracellulaire	
Cathepsine D	(Krishnamachary et al., 2003)
Collagène de type V	(Wykoff et al., 2000)
Fibronectine 1	(Krishnamachary et al., 2003)
MMP-2	(Krishnamachary et al., 2003)
PAI-1	(Kietzmann et al., 1999)
Prolyl-4-hydroxylase α	(Takahashi et al., 2000)
uPAR	(Krishnamachary et al., 2003)
Kératine 14/18/19	(Krishnamachary et al., 2003)
Vimentine	(Krishnamachary et al., 2003)
Facteurs de transcription	
Dec1	(Miyazaki et al., 2002)
Dec2	(Miyazaki et al., 2002)
ETS-1	(Oikawa et al., 2001)
Régulateurs de l'activité du HIF-1	
PHD1	(Erez et al., 2004)
PHD2	(Metzen et Ratcliffe, 2004)
Autres	
Rétrotransposon VL30	(Estes et al., 1995)
Isomérase triosephosphate	(Iyer et al., 1998)
Transglutaminase 2	(Wykoff et al., 2000)
Leptine	(Grosfeld et al., 2002)
Anhydrase carbonique 9	(Wykoff et al., 2000)
Hexokinase 1	(Iyer et al., 1998)
Hexokinase 2	(Iyer et al., 1998)
Téломérase hTERT	(Nishi et al., 2004; Yatabe et al., 2004)

Adapté de Semenza, G.L. et al, 2002 et Lee, J.W. et al, 2004

normoxique (21 % d'O₂) (Huang et al., 1996; Wang et al., 1995). Ainsi, les fonctions transcriptionnelles du HIF-1 dépendent étroitement de la disponibilité de la sous-unité régulable HIF-1 α . Tel qu'illustré à la figure 4, les deux sous-unités contiennent un ou des signaux de localisation nucléaire (NLS) ainsi qu'un motif hélice-boucle-hélice basique (bHLH). Ce motif est essentiel à la reconnaissance et à la liaison à l'ADN ainsi que pour l'hétérodimérisation des deux sous-unités. Cette région est suivie par un domaine PAS, dont le nom est un acronyme des trois facteurs de transcription où il a été identifié pour la première fois, soit le Per, l'Arnt et le Sim. Il est lui aussi important pour la formation de l'hétérodimère (Jiang et al., 1996). En plus de ces structures, le HIF-1 α , contrairement au HIF-1 β , possède un domaine de dégradation dépendante de l'oxygène (ODDD) (Huang et al., 1998). Ce domaine, qui représente le lien entre le HIF-1 α et les senseurs cellulaires d'oxygène, est essentiel à la dégradation normoxique et à la stabilisation hypoxique du HIF-1 α . Finalement, le HIF-1 β possède en C-terminal un domaine de transactivation (TAD) tandis que le HIF-1 α en possède deux. Le premier domaine TAD du HIF-1 α , probablement activé suite à la stabilisation du HIF-1 α , est situé en N-terminal et chevauche le domaine ODDD. Le deuxième est fonctionnellement indépendant du premier et se trouve en C-terminal (Jiang et al., 1997; Pugh et al., 1997).

Le gène encodant le HIF-1 α est constitutivement exprimé tout comme le HIF-1 β . Toutefois, en condition normoxique, le HIF-1 α est rapidement dégradé. Les bases moléculaires menant à sa destruction consistent en l'hydroxylation, l'ubiquitination et la dégradation par la voie des protéasomes (Distler et al., 2004). Chez les mammifères, l'hydroxylation est effectuée par trois prolyl hydroxylases nommées PHD1-3 (*prolyl hydroxylase-domain containing protein*) (Bruick et McKnight, 2001; Epstein et al., 2001). Ces enzymes



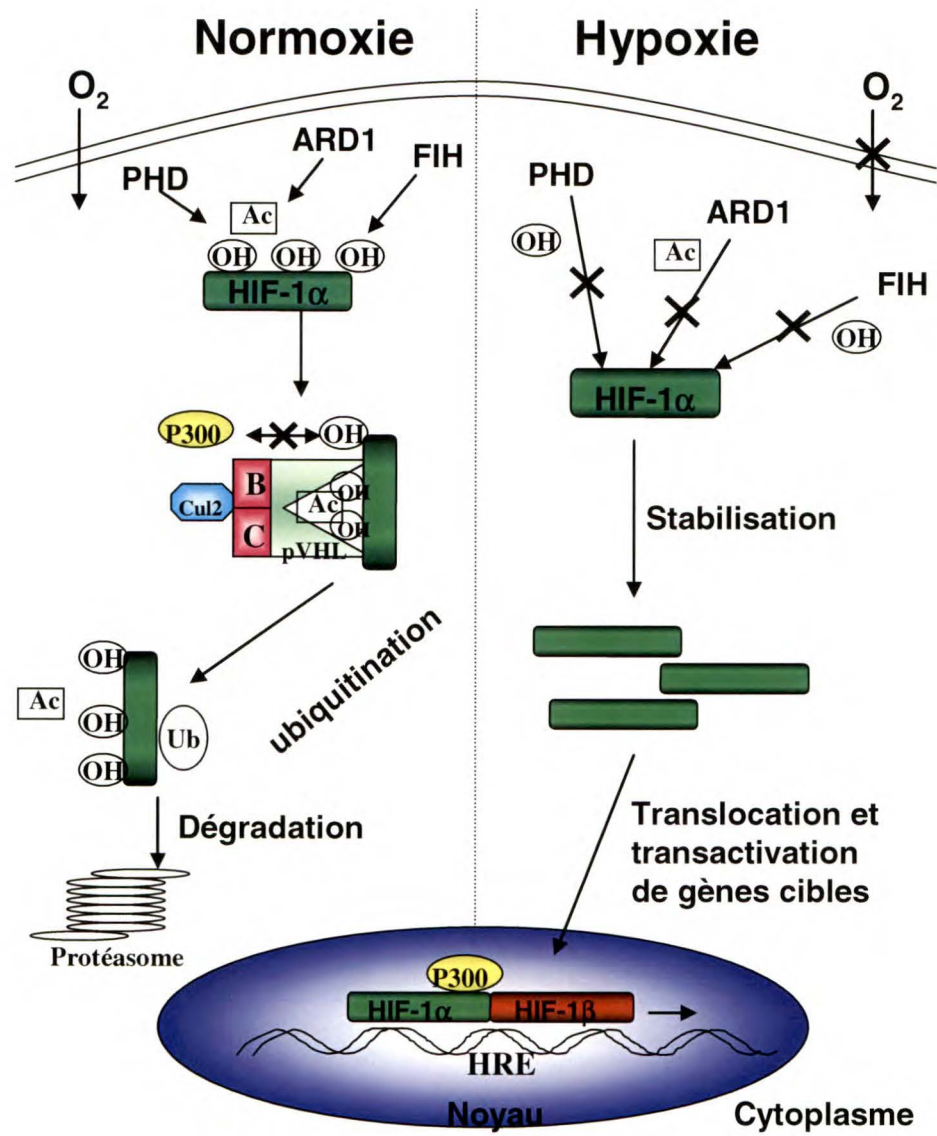
Adapté de (Dery et al., 2005)

Figure 4 : Représentation schématique des domaines fonctionnels du HIF-1 α et du HIF-1 β . Les deux sous-unités du HIF possèdent un ou plusieurs signaux de localisation nucléaire (NLS), essentiels à la translocation au noyau, et un motif hélice-boucle-hélice basique (bHLH) qui, avec le domaine Per/Arnt/Sim (PAS), est impliqué dans la dimérisation et la liaison à l'ADN. Le domaine de dégradation dépendante de l'oxygène (ODDD), unique au HIF-1 α , et les deux domaines de transactivation (C-TAD et N-TAD) subissent des modifications post-traductionnelles, soit l'hydroxylation (OH) des prolines 402 et 564 et de l'asparagine 803, l'acétylation (Ac) de la lysine 532 et la phosphorylation de la thréonine 796, afin de réguler l'expression et l'activité du HIF-1 α . De plus C-TAD et N-TAD peuvent lier des co-facteurs (p300/CBP, SRC-1 et REF-1) afin de faciliter l'activité du HIF-1 α .

hydroxylent le HIF-1 α sur les résidus proline situés aux positions 402 et 564 du domaine ODDD. Puisque ces dioxygénases dépendantes du fer utilisent l'O₂ et l'oxoglutarate en tant que co-substrats, leur habilité à modifier le HIF-1 α est limitée par la concentration en oxygène. Récemment, il a été démontré que la régulation normoxique du HIF-1 α est aussi régie par l'acétyltransférase ARD1 (*ADP-ribosylation factor domain protein*) (Jeong et al., 2002). Cette enzyme se lie directement au domaine ODDD et induit l'acétylation du résidu lysine situé à la position 532. Suite à ces modifications, la protéine suppresseuse de tumeur von Hippel Lindau (pVHL) se lie directement au domaine ODDD, seulement si celui-ci a été hydroxylé et acétylé (Maxwell et al., 1999). Le pVHL fait partie du complexe d'E3-ubiquitine ligase en combinaison avec l'élongine B, l'élongine C et la culline 2. Les liens hydrogène établis entre ce complexe et les hydroxyprolines du HIF-1 α permettent son ubiquitination, ce qui constitue un signal pour sa dégradation par les protéasomes (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001).

Lorsque la concentration en oxygène diminue, l'acétylation et l'hydroxylation du ODDD sont inhibées, ce qui empêche la liaison du pVHL, l'ubiquitination et la dégradation du HIF-1 α . On assiste alors à l'accumulation de cette sous-unité dans les cellules. Ensuite, grâce aux NLS, le HIF-1 α va transloquer au noyau et former un dimère avec le HIF-1 β (Kallio et al., 1998). Ce complexe va se lier à l'ADN de gènes cibles, via le domaine bHLH, à des sites HRE (élément de réponse à l'hypoxie) (Wenger, 2002). La séquence consensus minimale pour la liaison du HIF-1, connue sous le nom de HBS (*hypoxia-binding sequence*), est 5'-RCGTG-3', où R=A/G. Cette séquence essentielle n'est cependant pas suffisante pour l'induction maximale de certains gènes. En plus du HBS, la séquence optimale pour le HIF-1 est composée d'un HAS (*HIF-1 ancillary sequence*) dont le motif (5'-CACG/AG/T/C-3')

Figure 5 : Illustration de la régulation normoxique et hypoxique de l'expression et de l'activité du HIF-1 α . En condition normale d'oxygène, les PHD et le FIH induisent l'hydroxylation (OH) de la sous-unité HIF-1 α tandis que l'acétyltransférase ARD1 induit son acétylation (Ac). Ces modifications post-traductionnelles permettent la liaison de la protéine suppresseur de tumeur von Hippel Lindau (pVHL). Cette protéine fait partie du complexe d'E3-ubiquitine ligase, composé de l'élongine B (B), de l'élongine C (C) et la culline 2 (Cul2), qui permet l'ubiquitination (Ub) et la dégradation du HIF-1 α par le protéasome. En condition hypoxique, l'absence d'oxygène inhibe les PHD, l'ARD1 et le FIH, empêchant ainsi la liaison du pVHL et menant à la stabilisation du HIF-1 α . Cette sous-unité va transloquer au noyau, se dimériser avec le HIF-1 β , recruter des co-facteurs (p300) et lier les séquences HRE des promoteurs de gènes cibles afin de modifier leur expression.



Adapté de (Mazure et al., 2004) et Déry, et al., 2005

forme une séquence imparfaite et inversée du HBS (Kimura et al., 2001). Une fois le HIF-1 lié à l'ADN, le domaine TAD en C-terminal recrute des co-activateurs, tels que le CBP/p300, afin d'induire son activité transcriptionnelle (Arany et al., 1996; Ema et al., 1999). Cette activité est contrôlée en normoxie par le facteur inhibiteur du HIF-1 (FIH) (Mahon et al., 2001). Cette hydroxylase induit l'hydroxylation d'un résidu asparagine (Asn 803) situé à l'extrémité C-terminale du C-TAD du HIF-1 α , ce qui mène à une inhibition stérique de son interaction avec les co-activateurs. Toutefois, une diminution d'oxygène inhibe le FIH puisque, tout comme les PHD, il nécessite pour son activité de l'oxygène, du fer et de l'oxoglutarate. Ceci permet donc le recrutement des co-activateurs. Ces voies de dégradation et de stabilisation sont illustrées à la figure 5.

De plus en plus d'évidences indiquent que la stimulation de différents types cellulaires par des agents tels que des facteurs de croissance (dont le TGF β , le PDGF, et le FGF-2) et des cytokines (le TNF α et l'IL-1 β , par exemple) peut mener à l'induction et à l'activation du HIF-1 (Haddad et Land, 2001; Hellwig-Burgel et al., 1999; Richard et al., 2000). La liaison de ces ligands à leurs récepteurs active, entre autres, la voie de signalisation de la PI3 kinase et augmente les niveaux de HIF-1 α ainsi que son activité transcriptionnelle. De façon surprenante, cette accumulation de HIF-1 α est causée par l'induction de la synthèse protéique plutôt que par l'inhibition de sa dégradation. Ces agents peuvent aussi influencer l'activité transcriptionnelle du HIF-1 par la voie des MAPK. À la suite de l'activation des récepteurs, la kinase Raf est activée par phosphorylation directe ou par la protéine Ras et elle active les MEK qui phosphorylent les MAPK. Certains membres de cette famille d'enzymes, tels que p42/p44 et p38, vont à leur tour phosphoryler des résidus du HIF-1 α , ce qui augmente son activité transcriptionnelle (Richard et al., 1999; Sodhi et al., 2000). Le

TGF β 1 est un exemple intéressant de stimuli non-hypoxiques du HIF-1. En effet, les membres de notre laboratoire ont démontré récemment que ce facteur de croissance induit l'accumulation du HIF-1 via deux mécanismes, soit l'inhibition de l'expression de la PHD2, une enzyme impliquée dans la dégradation du HIF-1, et l'augmentation de la transcription du HIF-1 α (McMahon S et al, en soumission). Le TNF α est une autre molécule pertinente capable de stabiliser le HIF-1. Il a été établi que cette cytokine pro-inflammatoire induit l'accumulation du HIF-1 α en condition normoxique chez des chondrocytes humains et que cet effet est dépendant du facteur de transcription NF- κ B et de la voie des MAPK p38 (Coimbra et al., 2004). Le TNF α peut aussi induire, par la voie de la PI3K/Akt, la stabilisation, la liaison à l'ADN ainsi que l'activité du HIF-1 α chez les cellules tubulaires LLC-PK₁ (Sandau et al., 2001; Zhou et al., 2003).

1.2.3.2 Implication du HIF-1 dans la polyarthrite rhumatoïde

Tel que mentionné précédemment, on observe la présence de zones hypoxiques au niveau des articulations atteintes de PR. De plus, l'expression d'une variété de facteurs de croissance et de cytokines, pouvant stabiliser et activer le HIF-1 α , est augmentée lors du développement de cette pathologie, notamment l'IL-1 β et le TNF α . Il est donc raisonnable de croire que le facteur de transcription HIF-1 est induit chez ces tissus. Effectivement, un marquage par immunohistochimie de la membrane synoviale a révélé des taux d'expression du HIF-1 α très élevés chez les patients atteints de PR contrairement aux patients atteints d'ostéoarthrite (Hollander et al., 2001). L'augmentation de la protéine HIF-1 α au niveau des membranes synoviales arthritiques comparativement à celles qui sont normales a été confirmée dans une autre étude (Giatromanolaki et al., 2003). Récemment, le groupe de

Cramer a démontré que le HIF-1 α est essentiel pour l'initiation et la perpétuation de l'inflammation régies par les cellules myéloïdes (Cramer et al., 2003). L'absence de cette protéine diminue grandement la mobilité, l'infiltration et l'activité des leucocytes. Ces phénomènes suggèrent donc un rôle pour le HIF-1 dans le développement de la PR puisque ce type de cellules est essentiel pour sa pathogenèse. Une autre fonction possible de ce facteur de transcription est l'induction de l'angiogenèse. De façon analogue à la tumorigenèse, l'hyperplasie de la membrane synoviale et la formation du pannus requièrent de nouveaux vaisseaux sanguins (Koch, 2000). L'hypoxie, via le HIF-1, induit l'expression du VEGF, un puissant stimulateur d'angiogenèse (Forsythe et al., 1996; Leung et al., 1989). Le HIF-1 serait donc un joueur important dans la PR.

1.2.4 Le TNF alpha

Lors du développement de la PR, de nombreux changements sont observés dans le microenvironnement des articulations arthritiques, notamment l'induction de la production d'un large éventail de cytokines inflammatoires (Di Giovine et al., 1988; Feldmann et al., 1996b). De celles-ci, le TNF α est la principale cytokine impliquée dans l'inflammation de la PR et cause des dommages irréversibles aux articulations. Cette molécule est une glycoprotéine trimérique transmembranaire de type II, composée d'un court segment cytosolique en N-terminal, d'un domaine transmembranaire simple et d'un long domaine extracellulaire en C-terminal (Idriss et Naismith, 2000). Chez les mammifères, elle est exprimée par une variété de cellules inflammatoires activées telles que les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les éosinophiles, les cellules NK et les cellules T, mais aussi par des cellules non-inflammatoires incluant les astrocytes, les adipocytes, les kératinocytes et les fibroblastes (Tracey et Cerami, 1993). Cette cytokine pléiotropique est connue pour

affecter la croissance, la différenciation, la survie et les fonctions physiologiques d'une variété de cellules différentes (Beutler et Cerami, 1988; Beutler et Cerami, 1989).

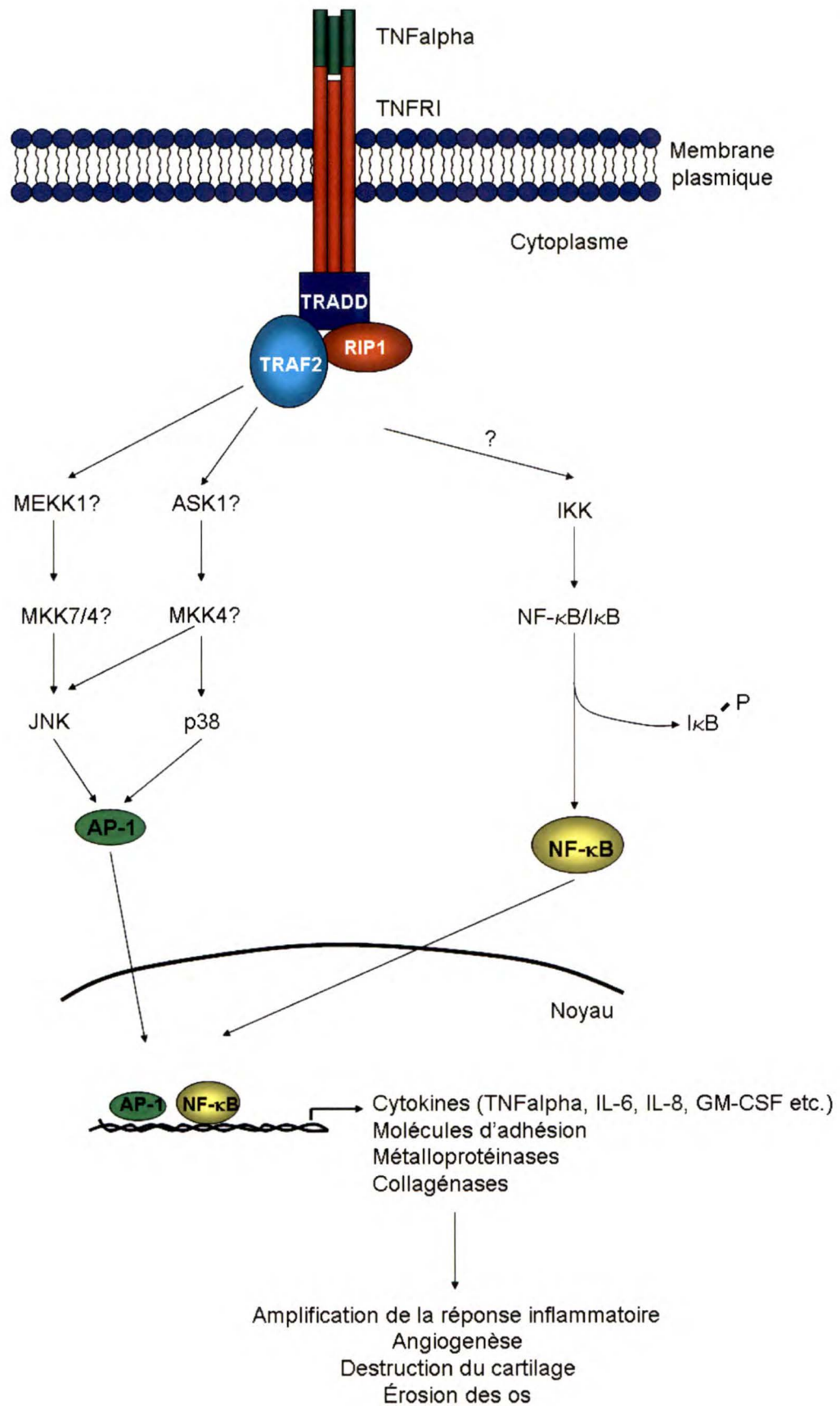
Le TNF α existe sous deux formes : la forme transmembranaire de 26 kDa et la forme soluble de 17 kDa. Le domaine extracellulaire soluble est relâché de la cellule via le clivage entre les résidus Ala76 et Val77 par la TACE. Les deux formes du TNF α sont actives mais elles induisent des voies de signalisation différentes par la liaison à deux récepteurs distincts qui diffèrent au niveau du domaine intracellulaire (Goetz et al., 2004; MacEwan, 2002). La forme transmembranaire du TNF α a une plus haute affinité pour le TNFRII (p75). Elle agit lorsqu'il y a contact entre les cellules (signalisation juxtacrine) tandis que la forme soluble peut agir de façon paracrine, à des sites distants de la cellule productrice, et promouvoir les effets systémiques de cette cytokine via le récepteur TNFRI (p55) (Grell et al., 1995; Mueller et al., 1999).

Ces deux récepteurs sont présents à la membrane plasmique de la majorité des types cellulaires, à l'exception des érythrocytes (Wallach et al., 1999). La liaison du TNF α induit la trimérisation du récepteur et le recrutement de plusieurs protéines de signalisation au domaine cytoplasmique du récepteur qui mènent à l'activation de deux facteurs de transcription majeurs, AP-1 et NF- κ B, régulant l'expression de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire aiguë et chronique (Hsu et al., 1996; Rothe et al., 1994). La protéine TRADD (*TNFRI-associated death domain protein*) est la première à être recrutée et elle sert de plateforme au recrutement de deux autres médiateurs, soit le RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) et le TRAF2 (*TNF-receptor-associated factor 2*) lors de l'activation du TNFRI

(Stanger et al., 1995). Par ailleurs, le TNFRII activé recrute directement le TRAF2 qui, à son tour, recrute le TRAF1 (Rothe et al., 1995). Le TRAF2 joue donc un rôle central dans les événements précoces, communs aux deux récepteurs, résultant en l'activation d'IKK et des MAPK (JNK et p38). Des analyses structurales et biochimiques ont révélé que le TRAF2 a une plus grande affinité pour le TRADD que pour le TNFRI ou le TNFRII. Ce phénomène peut expliquer pourquoi le TNFRI, qui utilise le TRADD en tant que protéine adaptatrice, induit une meilleure réponse que le TNFRII qui n'interagit pas avec cette protéine (Park et al., 2000). À cause de son importance, la voie de signalisation du TNFRI sera discutée plus en détail (figure 6).

Suite au recrutement du TRAF2 au TNFRI via la protéine TRADD, le TRAF2 induit l'activité de plusieurs MAPKKK menant, par la phosphorylation de MAPKK, à l'induction de JNK ou de p38 (Baud et al., 1999; Minden et al., 1994; Nishitoh et al., 1998; Yuasa et al., 1998). La kinase MEKK1 est un activateur puissant de la cascade JNK et l'utilisation de mutants inactifs suggère son implication dans la voie de signalisation du TNF α (Liu et al., 1996; Xia et al., 1998). Cependant, l'analyse de cellules déficientes en MEKK1 soutient un rôle pour cette kinase dans l'activation de JNK par le TNF α seulement chez les cellules souches embryonnaires et non chez les fibroblastes et les cellules T (Xia et al., 2000; Yujiri et al., 2000). La MAPKKK ASK1 est un autre candidat intéressant dans l'induction de JNK et aussi de p38 par le TNF α . Toutefois, l'activation de JNK et de p38 chez les cellules déficientes en ASK1 est normale dans la phase précoce de signalisation par le TNF α et est partiellement affectée seulement lors d'une stimulation soutenue (Tobiume et al., 2001). Il est donc possible que plusieurs MAPKKK contribuent partiellement et de façon additive à la signalisation du TNF α mais cette hypothèse demeure à confirmer. Tel que mentionné

Figure 6 : Voies de signalisation du TNF α . La liaison du récepteur au TNF α (TNFRI) par son ligand induit sa trimérisation et son activation. Une fois activé, le domaine cytoplasmique du récepteur recrute la protéine de signalisation TRADD, qui recrute à son tour les protéines TRAF2 et RIP-1. Le TRAF2 active, possiblement via les MAPKKK MEKK1 et ASK1 ainsi que les MAPKK MKK4 et 7, les kinases JNK et p38. Ces deux kinases activent ensuite le facteur de transcription AP-1. Ce dernier transloque au noyau afin de réguler l'expression de gènes cibles. Le TRAF2, en combinaison avec le RIP-1, active aussi le complexe IKK via un mécanisme encore inconnu. Ce complexe activé phosphoryle l'inhibiteur I κ B, libérant ainsi le NF- κ B. Ce facteur de transcription est maintenant libre de transloquer au noyau où, avec l'AP-1, il régule la production de gènes cibles impliqués dans l'inflammation et la pathogenèse de la PR.



précédemment, ces MAPKKK phosphorylent ensuite des MAPKK, possiblement les MKK4 et 7, afin d'activer JNK et p38 (Nishitoh et al., 1998; Yuasa et al., 1998). Ces deux kinases sont responsables de l'activation du facteur de transcription AP-1 qui, une fois transloqué au noyau, régule l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation (Karin et al., 1997). D'autre part, même si le TRAF2 est suffisant pour induire la voie de signalisation du NF- κ B, l'activation optimale de cette voie requiert la présence de la protéine RIP1 (Devin et al., 2000). En effet, cette protéine interagit avec la sous-unité régulatrice IKK γ /NEMO tandis que le TRAF2 recrute au TNFRI activé le complexe IKK, qui contient les sous-unités catalytiques IKK α et IKK β (Karin et Ben-Neriah, 2000). Une fois le complexe IKK activé, par un mécanisme encore inconnu, il phosphoryle l'inhibiteur I κ B et induit sa dégradation afin de libérer le NF- κ B. Ce facteur de transcription est maintenant apte à transloquer au noyau et à moduler l'expression de gènes cibles, tout comme l'AP-1 décrit précédemment. Puisque le promoteur du gène encodant le TNF α contient des sites de liaison pour ces deux facteurs de transcription, cette cytokine pro-inflammatoire est donc sujette à une auto-régulation positive importante pour l'amplification de la réponse inflammatoire (Baud et Karin, 2001).

Tel que mentionné précédemment, on observe une forte expression de TNF α dans les articulations arthritiques (Di Giovine et al., 1988; Feldmann et al., 1996b). Le recrutement et l'activation des monocytes et macrophages au niveau de la membrane synoviale résultent en la sécrétion de cette cytokine qui induit une panoplie de processus responsables de la destruction de l'articulation (Arend et Dayer, 1995; Subramanian et Handa, 2004). Tout d'abord, le TNF α induit la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-6,

l'IL-8 et le GM-CSF et de molécules d'adhésion qui amplifient l'inflammation via l'infiltration et l'activation de cellules inflammatoires (Marinova-Mutafchieva et al., 1997; Roberts et McColl, 2004). Le TNF α est aussi un stimulateur puissant des fibroblastes synoviaux, des ostéoclastes et des chondrocytes qui relâchent des collagénases et des métalloprotéinases favorisant la dégradation de la matrice extracellulaire, la destruction du cartilage et l'érosion des os (Shingu et al., 1993). Finalement, le TNF α est un facteur pro-angiogénique important impliqué dans la prolifération, la différenciation et la mobilité des cellules vasculaires endothéliales (Bauvois, 2004). La formation de ces nouveaux vaisseaux sanguins contribue à la pathogenèse de la PR (Koch, 2000). L'importance capitale du TNF α dans le développement de la PR a incité de nombreux chercheurs à élaborer des inhibiteurs de cette cytokine afin de traiter cette pathologie (Goldblatt et Isenberg, 2005). Par exemple, l'infliximab et l'etanercept sont deux médicaments efficaces pour atténuer les symptômes de la PR. Malheureusement, ces traitements ne guérissent aucunement la maladie et peuvent entraîner des effets secondaires, quelques fois bénins (maux de tête, nausée et irritation locale de la peau), mais parfois importants tels que des infections bactériennes graves (tuberculose), la formation de lymphomes et des désordres de démyélination (Day, 2002). C'est pourquoi la recherche de traitements visant d'autres cibles est essentielle.

1.3 Objectifs et pertinence de la présente recherche

La TACE est impliquée dans la protéolyse d'une variété de molécules. L'une d'entre elles est la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Cette protéine transmembranaire doit être clivée par la TACE afin d'être relâchée sous une forme soluble et active qui joue un rôle capital dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde (PR) (Patel et al., 1998). La surexpression de la TACE a été démontrée au niveau des articulations atteintes de PR. L'inhibition de cette enzyme a résulté en une diminution des symptômes chez des rats arthritiques (Conway et al., 2001). Ces évidences suggèrent donc un rôle pour la TACE dans la pathogenèse de cette affection, ce qui en fait une cible intéressante pour d'éventuels traitements. Malheureusement, les mécanismes de régulation de cette enzyme ne sont pas bien caractérisés.

Les objectifs de cette recherche consistent donc à évaluer l'implication de certains facteurs, présents au niveau des articulations arthritiques, dans la régulation de la TACE ainsi que les mécanismes empruntés par ces facteurs (figure 7). Nous avons choisi, comme stimuli inflammatoires, l'hypoxie et le TNF α puisque leur présence dans les articulations arthritiques est bien documentée. Tout d'abord, nous avons regardé les effets de ces deux stimuli, séparément ou en combinaison, sur l'expression de l'ARN messager et de la protéine TACE. De plus, nous avons évalué l'impact d'une stimulation par l'hypoxie et le TNF α sur une des activités protéolytiques de la TACE, soit le relâchement du TNF α . Puis les mécanismes de régulation de cette enzyme par l'hypoxie et le TNF α ainsi que les éléments contenus dans son promoteur responsables de la régulation par le HIF-1 ont été

étudiés par essais luciférase. Finalement, nous avons évalué l'effet d'un facteur anti-inflammatoire, la dexaméthasone, sur la régulation hypoxique du promoteur de la TACE.

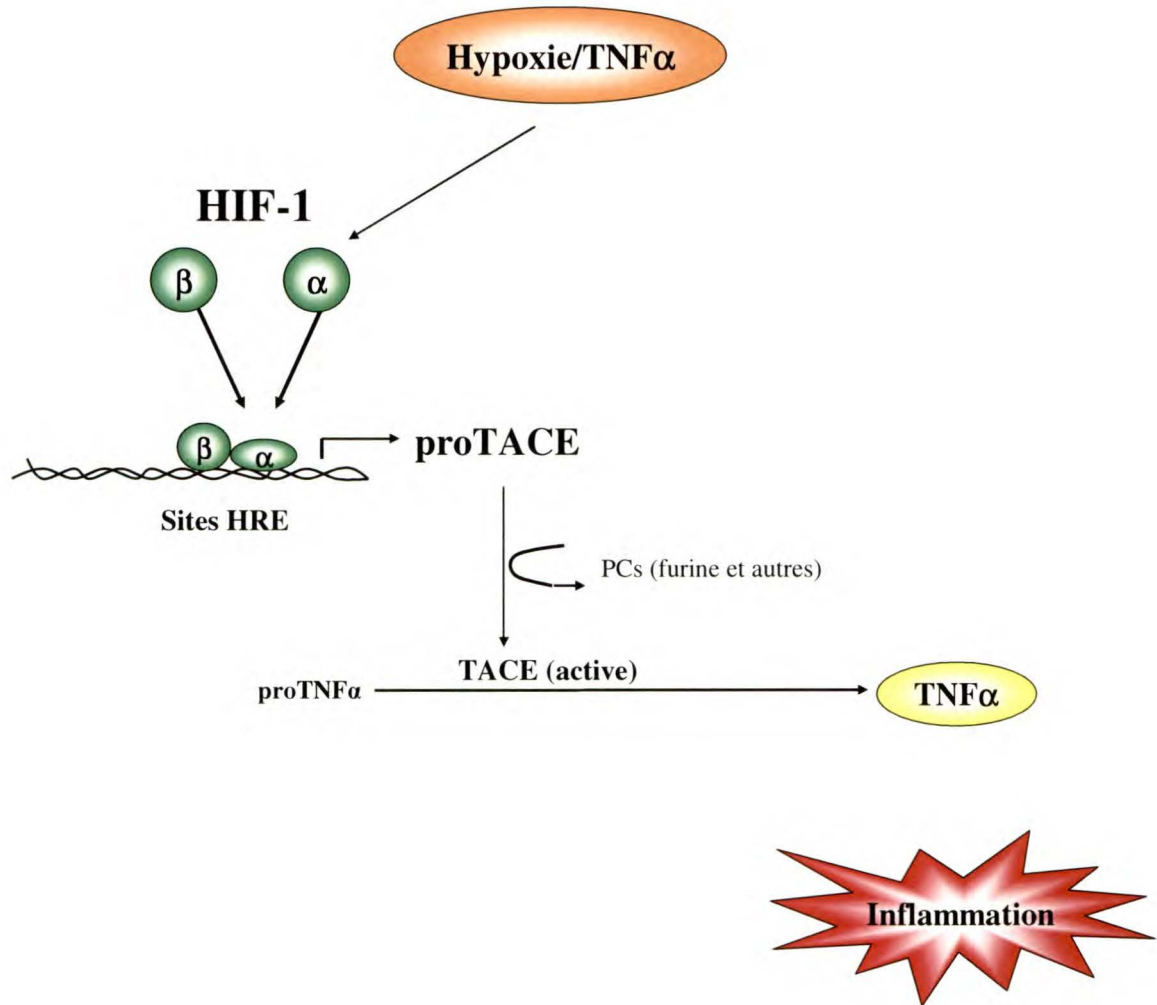


Figure 7 : Hypothèse de recherche. L'hypothèse de départ de ce projet de recherche suppose que l'hypoxie et le TNF α , deux conditions présentes en milieu inflammatoire, stabilisent la sous-unité HIF-1 α qui va ensuite se dimériser avec le HIF-1 β . Le complexe HIF-1 ainsi formé se lie aux éléments de réponse HRE présents au niveau du promoteur de la TACE et régule à la hausse la transcription de ce gène. Par la suite, la proTACE est maturée et activée par les convertases de proprotéines, tel qu'il a été démontré précédemment dans notre laboratoire. Finalement, la TACE active clive le TNF α transmembranaire (proTNF α) afin de générer le TNF α soluble, impliqué dans le développement de l'inflammation.

2- MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Culture primaire de synoviocytes de type B

Les rats Lewis femelles (100-124 g) (Harlan Sprague Dawley Inc, IN, USA) ont été sacrifiées et les corps adipeux infra-patellaires recouvrant les membranes synoviales ont été prélevés et déposés dans des boîtes de Pétri contenant de la saline tamponnée au phosphate (PBS) en présence de 1 % d'antibiotique Pen-Strep (100 U de pénicilline et 0,1 mg/ml de streptomycine) (Sigma, Oakville, ON, Canada). Ils ont été lavés dans le PBS contenant 1 % de Pen-Strep pendant 20 minutes sur glace. Ensuite, ils ont été coupés en morceaux fins et digérés dans 2 µg/ml de collagénase de type IV (Sigma) dissoute dans du PBS contenant 1 % de Pen-Strep et incubés pendant 2 heures à 37°C en présence de 5 % CO₂. Les morceaux de tissus ont ensuite été centrifugés pendant 10 minutes à 172 x g, les culots ont été resuspendus dans du milieu DMEM-F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12*) (Gibco BRL, Burlington, ON, Canada) contenant 20 % de sérum bovin fœtal (FBS) (Bio-Media Canada, Drummondville, Qc, Canada), 40 µg/ml de gentamycine (Schering Canada Inc, Pointe-Claire, Qc, Canada) et 1 % de Pen-Strep et incubés à 37°C en présence de 5 % CO₂. Après deux semaines de culture, l'ajout de la solution de Pen-Strep a cessé et la concentration en sérum a été diminuée à 10 %.

2.2 Cultures cellulaires

Les cellules macrophagiques murines RAW264.7 (ATCC, Rockville, Maryland, USA) ont été cultivées dans du milieu DMEM (Gibco BRL) contenant 10 % FBS, 1 mM de pyruvate de sodium (HyClone, Logan, Utah, USA), et 40 µg/ml de gentamycine.

La lignée cellulaire d'hépatome de souris Hepa-1 c1c7 (ATCC), les cellules Hepa-1 c4, dérivées des cellules Hepa-1 c1c7 (un don généreux du Dr Oliver Hankinson de l'Université de Californie, Los Angeles, USA) ainsi que les cellules fibroblastiques embryonnaires de souris (MEF) de type sauvage et celles déficientes en HIF-1 α (fournies généreusement par le Dr Darren Richard du Centre de Recherche de l'Hôtel-dieu, Qc, Canada) ont été cultivées dans du milieu MEM (*Minimal Essential Medium*) (Gibco BRL) contenant 10 % FBS et 40 μ g/ml de gentamycine.

Toutes ces lignées cellulaires, ainsi que la culture primaire de synoviocytes de type B, ont été gardées dans un incubateur humidifié, à 95 % air et 5 % CO₂. Pour les stimulations en normoxie et en hypoxie, ainsi que celles avec le TNF α , l'actinomycine D, les inhibiteurs de kinases et la dexaméthasone, les cellules ont été privées de sérum et placées dans une chambre humide hermétique maintenue à 1 % O₂, 5 % CO₂ et 94 % N₂ pour différentes périodes de temps, selon les indications fournies dans les légendes des figures. Les cellules ont été stimulées en l'absence de sérum afin d'éviter que les facteurs de croissance, contenus dans le FBS, modifient l'expression de la TACE.

2.3 RT-PCR et PCR quantitatif en temps réel

Les cellules ont étéensemencées à une densité de $2,0 \times 10^6$ de cellules par boîte de Pétri, privées de sérum et stimulées, pendant différentes périodes de temps, en hypoxie avec ou sans 20 ng/ml de TNF α murin. Lorsque indiqué dans la légende des figures, les cellules ont été prétraitées avec 20 μ g/ml d'actinomycine D (Merck Frosst, Kirkland, Qc, Canada) pendant 30 minutes avant la stimulation. L'ARN des cellules a été isolé à l'aide du *Tri-*

Reagent (Molecular Research Center Inc) selon les indications du fabricant et la concentration finale en ARN des échantillons a été dosée au spectrophotomètre.

Pour la transcription inverse (RT), 2,5 µg d'ARN, 1 pM de décamères aléatoires (Ambion, Austin, Texas, USA), 1 mM de dNTP, 4 µl de *First-Strand Buffer* (Invitrogen, Californie, USA) et 200 U de *Superscript II* (Invitrogen) ont été additionnés dans un volume final de 20 µl. La réaction s'est déroulée pendant 1 heure à 42°C. Pour l'amplification par PCR de l'ADNc, 2,5 µl de RT, 1 mM de dNTP, 50 pmole de chacun des oligonucléotides de synthèse (voir le tableau V), le tampon de PCR 1X (Roche Diagnostique) et 1,25 U de Taq polymérase (Roche Diagnostique) ont été préparés dans un volume final de 50 µl complété avec de l'eau. La réaction de PCR a été effectuée pendant 35 cycles d'amplification avec une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C, une température d'appariement de 68°C pour 45 secondes et une étape d'élongation de 30 secondes à 72°C. La réaction a été précédée d'une étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C et terminée par une étape d'élongation de 6 minutes à 72°C. Les produits de PCR ont ensuite été migrés sur un gel d'agarose 1,5 % contenant 0,33 µg/ml de bromure d'éthidium, permettant la détection des bandes d'ADN lors de la visualisation aux rayons UV.

Pour le PCR quantitatif en temps réel (qRT-PCR), deux courbes standards, une pour le gène du 18S et une pour celui de la TACE, ont été générées dans le vecteur pGEM-T (Promega). L'ADN du 18S et de la TACE, obtenu par PCR tel que décrit ci haut et contenu dans les bandes d'agarose, a été purifié à l'aide de la trousse *DNA gel extraction kit* (Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canada), selon les indications du fabricant. Ces gènes ont été insérés

Tableau V : Liste des oligonucléotides utilisés au cours de la présente recherche ainsi que leur séquence

Nom	Séquence	Techniques
rTACE-Sens	5'-GGC AAC TCC AGG GTG GAC GAA GGA-3'	RT-PCR et qRT-PCR
rTACE-AS	5'-ATC TTC AGC ATC TCC TGG TGG GGG-3'	RT-PCR et qRT-PCR
18S-Sens	5'-AGG AAT TGA CGG AAG GGC AC- 3'	RT-PCR et qRT-PCR
18S-AS	5'-GTG CAG CCC CGG ACA TCT AAG-3'	RT-PCR et qRT-PCR
pTACE-SacI	5'-GGC <u>CGA GCT CGA</u> CTA AGA TAA AGG CTT GTA GCC-3' ¹	Clonage du vecteur pTACE-Luc et mutation de H3 et H4
pTACE-XhoI	5'-GGC <u>CCT CGA GGT</u> TCC CGT CCA CCA CCTCTCTGG-3' ²	Clonage du vecteur pTACE-Luc et pTACE-H6 et mutation de H3 et H4
pTACE-H6	5'-GGC <u>CGA GCT CGG</u> CGG CGC GGG AGG GAG AAG TTT-3' ¹	Clonage de pTACE-H6
H3-muté	5'-CCC CCC AAA AAA ATG GCC AAA GTC AGT AAC-3'	Mutation de H3
H4-muté	5'-CGC CGA ACA GGC CAC CCG ATC CCG GTG GGG CGG ATC-3'	Mutation de H4

1-Les lettres soulignées représentent le site de clivage pour l'enzyme de restriction SacI.

2-Les lettres soulignées représentent le site de clivage pour l'enzyme de restriction XhoI.

dans le vecteur pGEM-T selon les instructions du manufacturier à un ratio insert:vecteur de 10:1. La réaction de PCR a été effectuée en duplicata, dans un volume final de 25 µl de même composition que celle utilisée pour le PCR traditionnel mais, cette fois, avec 2,5 mM de MgCl₂ et 1,6 µl d'une dilution de 1 dans 1000 de SYBR Green (Corbett Research, Kirkland, Qc, Canada). Les étapes d'amplification décrites précédemment ont été utilisées pour amplifier les échantillons inconnus et ceux de la courbe standard à l'aide d'un appareil *Rotor-Gene 3000* (Corbett Research). La concentration des échantillons a été calculée par le logiciel *Rotor-Gene 6.0* fourni avec l'appareil.

2.4 Préparation des lysats cellulaires et extraits nucléaires

Les cellules ont étéensemencées à une densité de $1,0 \times 10^6$ de cellules/boîte de Pétri pour les lysats cellulaires et de $5,0 \times 10^6$ de cellules/boîte de Pétri pour les extraits nucléaires. Elles ont ensuite été privées de sérum une heure avant d'être stimulées pendant 16 heures en hypoxie avec ou sans 20 ng/ml de TNF α murin. Les lysats cellulaires ont été préparés à l'aide d'un tampon de lyse composé de 150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCL, 1 % de NP-40, 0,5 % de Na-déoxycholate, 0,1 % de SDS, 5 mM d'EDTA et d'un cocktail d'inhibiteur de protéase (*Mini complete protease inhibitor cocktail*) (Roche Diagnostique, Laval, Qc, Canada). Les lysats cellulaires ont ensuite été incubés pendant 30 minutes à 4°C sur une plateforme rotative puis centrifugés pendant 30 minutes à 15000 x g à 4°C. Les surnageants ont été recueillis et le contenu en protéine a été dosé à l'aide d'un essai colorimétrique, selon les directives du fournisseur (*BCA proteins assay kit*) (Pierce, Rockford, IL, USA). La lecture des échantillons a été effectuée par un lecteur de plaque automatique à une longueur d'onde de 550 nm (Modèle 3550, Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) et le logiciel

Microplate Manager, fourni avec l'appareil, a évalué la concentration protéique des échantillons.

Pour les extraits nucléaires, les cellules ont été recueillies dans du PBS contenant 1 µg/ml de leupeptin, d'aprotinin et de pepstatin ainsi que 1 mM de PMSF, 0,5 mM de DTT, 50 nM de MG-132 et 1 mM d'orthovanadate de sodium et centrifugées 4 minutes à 500 x g à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans 500 µl de tampon de lyse (composé de 10 mM de Tris-base à pH 7,4, de 10 mM de NaCl, de 3 mM de MgCl₂, de 0,5 mM d'EDTA, de 0,5 mM d'EGTA et des mêmes inhibiteurs que ceux utilisés avec le PBS) et incubés 10 minutes sur glace. Cinq cents microlitres de tampon NP-40 (même composition que le tampon de lyse plus 0,2 % de NP-40) ont été ajoutés aux échantillons qui ont ensuite été centrifugés 5 minutes à 2000 x g à 4°C. Les culots ont été resuspendus dans 1,1 ml de tampon de lyse et centrifugés. Finalement, les culots ont été resuspendus dans 20 µl de tampon NEB (même composition que le tampon de lyse plus 100 µl de glycérol) et du NaCl 4 M a été ajouté pour une concentration finale de 400 mM. Les échantillons ont été incubés sur glace 15 minutes avant d'être centrifugés 12 minutes à 15000 x g à 4°C. Les surnageants, contenant maintenant les protéines nucléaires, ont été recueillis et dosés avec le réactif de Bradford (Bio-Rad), selon les indications du fabricant. La lecture des échantillons a été effectuée tel que décrit pour les lysats cellulaires mais cette fois avec une longueur d'ondes de 595 nm.

2.5 Immunobuvardage de type Western

Pour les immunobuvardages, 150 µg de protéine, pour les lysats cellulaires, et 50 µg de protéine, pour les extraits nucléaires, ont été mélangés à un volume égal de tampon

d'échantillon 2X (0,125 M Tris-HCl pH6,8, 4 % SDS, 20 % glycérol, 0,025 % bleu de bromophénol et 10 % 2-mercaptoéthanol). Les échantillons ont été bouillis pendant 5 minutes et déposés sur un gel de polyacrylamide dénaturant. Le gel condensateur était composé d'une solution de 4 % de bis-acrylamide et de 24 % de tampon condensateur (0,5 M Tris-base et 4 % SDS, pH 6,8) tandis que le gel séparateur contenait 7,5 % de bis-acrylamide et 25 % de tampon séparateur (4 % SDS et 1,5 M Tris-base, pH 8,8). L'électrophorèse a été effectuée à 110 volts pendant 90 minutes à l'aide d'un appareil de migration électrophorétique de type *Mini-Protean II Cell* (Bio-Rad), dans un tampon d'électrophorèse (1 % SDS, 25 mM Tris-base, 0,25 M glycine). Les protéines séparées ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose PVDF (Roche Diagnostique) pendant 75 minutes à 110 volts dans un tampon de transfert (25 mM Tris-base, 0,2 M glycine et 20 % méthanol).

À la suite du transfert, les membranes ont été bloquées pendant 30 minutes avec agitation à 24°C dans une solution composée de 5 % de lait en poudre Carnation dilué dans du PBS. Les membranes ont ensuite été incubées pendant 16 heures à 4°C sur une plateforme rotative avec l'anticorps primaire, soit un IgG de lapin (1:1000) dirigé contre la TACE (Chemicon International, Temecula, CA, USA), pour les lysats cellulaires, et un IgG de souris (1:500) dirigé contre le HIF-1 α (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) pour les extraits nucléaires. Les membranes ont été lavées 3 fois pendant 10 minutes à 24°C dans du PBS contenant 0,05 % Tween-20 (Bio-Rad) et incubées avec agitation pendant trois heures à 24°C avec l'anticorps secondaire, soit un IgG anti-lapin (1:5000) pour la TACE et un IgG anti-souris (1:2500) pour le HIF-1 α , tous deux couplés à la peroxidase (Amersham, Oakville, ON,

Canada). Les lavages au PBS-Tween décrits précédemment ont été répétés et les bandes correspondant aux protéines ayant été liées par les anticorps ont été révélées à l'aide d'une trousse de révélation ECL (Amersham) selon les directives du fabricant. À la suite de la révélation, les membranes ont été déposées dans une cassette d'exposition sur un film de type *Hyperfilm ECL* (Amersham) afin de visualiser les bandes immunoréactives.

2.6 Microscopie confocale

Les synoviocytes ont étéensemencés à une densité de $0,15 \times 10^6$ de cellules par puits d'une plaque à 6 puits sur des lamelles stériles. Les cellules ont été privées de sérum une heure avant la stimulation hypoxique de 16 heures, avec ou sans 20 ng/ml de TNF α murin. Elles ont ensuite été lavées au PBS froid et fixées 15 minutes à -20°C dans une solution de méthanol/acétone (30/70) froide. Cette solution a ensuite été enlevée pour permettre aux cellules de sécher 10 minutes à l'air ambiant. Les cellules ont été réhydratées 15 minutes dans du PBS et perméabilisées pendant 5 minutes dans du PBS contenant 0,1 % de triton. Les sites de liaison non spécifiques ont été bloqués par une incubation des cellules, à la température de la pièce, de 20 minutes dans du PBS contenant 2 % d'albumine de sérum bovin (BSA). L'anticorps primaire dirigé contre la TACE (Chemicon) a ensuite été incubé, à une dilution de 1 μ l dans 100 μ l de PBS+BSA 2 %, avec les cellules pendant 16 heures à 4°C. Après les lavages avec du PBS, les cellules ont été incubées avec l'anticorps secondaire, un anti-Rb-Cy2 dilué dans du PBS+BSA 2 % (1:200), pendant 1 heure à la température de la pièce. Finalement, les cellules ont été lavées au PBS et les lamelles ont été montées sur des lames avec du FluoroGuard (Bio-Rad). La localisation cellulaire de la TACE a été examinée à l'aide d'un microscope confocal à balayage (NORAN Instruments

Inc, Middleton, WI, USA) équipé d'un laser krypton/argon. Les images obtenues ont été traitées avec le logiciel INTERVISION (NORAN Instruments Inc.) sur une station informatique Silicon Graphics O2 opérant avec le système d'exploitation UNIX. La représentation tridimensionnelle pseudocolorée de la fluorescence a été obtenue par la combinaison des images 2D avec la valeur de l'intensité des pixels à l'aide du logiciel *ImageJ public domain* (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.7 Dosage du TNF α par ELISA

Les synoviocytes ont été transfectés de façon transitoire par électroporation à l'aide d'un appareil *Nucleofector*, provenant de la compagnie *Amaga Biosystems* (Gaithersburg, MD, USA). À la suite de la trypsination et du lavage des synoviocytes dans du PBS, 2×10^6 de cellules ont été resuspendues dans 100 μ l de tampon d'électroporation (25 mM d'hepes à pH 7,6, 125 mM de KCl, 2 mM de $MgCl_2$, 10 mM de K_2HPO_4 , 10 mM de KH_2PO_4 et 5 mM de N-acétyl cystéine) et 5 μ g du vecteur pcDNA3-TNF humain ont été ajoutés à chaque cuvette. Le programme U23 a été utilisé pour transfecter les cellules qui ont ensuite été transférées immédiatement dans une boîte de Pétri de culture. Vingt-quatre heures après la transfection, les cellules ont été privées de sérum et stimulées pendant 16 heures en hypoxie, avec ou sans 20 ng/ml de TNF α murin. Les surnageants ont été recueillis et les lysats cellulaires ont été préparés tel que décrit dans la section Préparation des lysats cellulaires et des extraits nucléaires. La concentration de TNF α contenue dans les surnageants et les lysats cellulaires a été évaluée à l'aide d'une trousse ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

2.8 Construction des plasmides pour les transfections transitoires

Les vecteurs pcDNA3-HIF-1 α , pcDNA3-HIF-1 β et (HRE)₃-Luc ont été offerts gracieusement par le Dr Darren Richard (Centre de Recherche de l'Hôtel-dieu, Qc, Canada) tandis que le Dr Patrick McDonald (Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Qc, Canada) nous a fait le don des vecteurs pNF- κ B-Luc et IkBSR. Le Dr Franck Peiretti (Laboratoire d'hématologie, Marseille, France) nous a gentiment offert le vecteur pcDNA3-TNF humain.

Pour le clonage du promoteur de la TACE, l'ADN a été extrait de cellules RAW264.7 ou de cellules provenant de souris Balb/c ou de souris C57BL/6J (offertes généreusement par le Dr Ilangumaran de l'Université de Sherbrooke) à l'aide du *Tri-Reagent* (Molecular Research Center Inc, Cincinnati, OH, USA) selon les directives du fabricant. La séquence du promoteur a été amplifiée par PCR en utilisant les oligonucléotides pTACE-SacI et pTACE-XhoI (voir tableau V pour les séquences) dans les conditions d'amplification suivantes : une dénaturation initiale de 15 secondes à 95°C, 35 cycles d'amplification avec une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C, une température d'appariement de 59°C pour 60 secondes et une étape d'élongation de 2 minutes à 72°C, suivis d'une élongation finale de 8 minutes à 72°C. Le fragment produit de 2304 paires de bases a été digéré avec les enzymes de restriction SacI et XhoI et inséré dans le vecteur pGL2 (Promega Corporation, Madison, WI, USA) digéré avec les mêmes enzymes de restriction. Le plasmide résultant (pTACE-Luc) a été envoyé au service de séquençage *DNA Sequencing Laboratory* de l'Université de Calgary pour y être séquençé.

Après la vérification de sa séquence, le plasmide pTACE-Luc a été utilisé pour produire quatre des cinq plasmides délétants. Les plasmides pTACE-KpnI, -SpeI, -SwaI et -SmaI ont été générés par digestion du plasmide pTACE-Luc à l'aide de l'enzyme de restriction appropriée tandis que le délétant pTACE-H6 a été généré par PCR, à partir de l'ADN provenant des cellules de souris C57Bl/6J, en utilisant la même technique que celle décrite ci-dessus pour le plasmide pTACE-Luc (voir tableau V pour la séquence des oligonucléotides). Tous les délétants ont ensuite été séquencés.

Les séquences H3-HBS et H4-HRE, situées respectivement aux positions -960 et -607 du promoteur de la TACE, ont été mutées par PCR. Le motif H3 5'-AATGTGC-3' a été remplacé par 5'-AATGGCC-3' et/ou le motif H4 5'-GCACACCCGATCCGCGTGG-3' par 5'-GGCCACCCGATCCCGGTGG-3' (les lettres soulignées représentent les paires de bases qui ont été mutées). Chaque mutant a été vérifié par séquençage direct.

2.9 Essais luciférase

Les cellules ont étéensemencées à une densité de $0,1 \times 10^6$ de cellules par puits d'une plaque à six puits et elles ont été transfectées de façon transitoire par la technique de précipitation au CaPO_4 en utilisant la trousse *Mammalian Cell Transfection* (Specialty Media, Lavallette, NJ, USA) selon les indications du fabricant. Vingt-quatre heures après la transfection de 2 μg par puits de vecteurs, tel que spécifié dans les légendes des figures, les cellules ont été privées de sérum trois heures avant l'incubation en condition hypoxique avec 0, 2 ou 20 ng/ml de $\text{TNF}\alpha$ murin (PeproTech Canada Inc, Ottawa, ON, Canada). Lorsque indiqué, les cellules ont été traitées soit avec de la dexaméthasone (Sigma), soit avec les inhibiteurs

de MAPK SB202190 (BIOMOL, Philadelphie, PA, USA) et U0126 (Sigma) à une concentration finale de 5 μ M. Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon à pH 7,8 contenant 25 mM de Gly-Gly, 8 mM de MgSO_4 , 4 mM d'EGTA, 1 % de triton et 2 mM de DTT. Après une centrifugation, l'activité luciférase du surnageant, combiné au tampon de lecture à pH 7,6 (25 mM de Gly-Gly, 15 mM de MgSO_4 , 4 mM d'EGTA, 15 mM de KH_2PO_4 et 5 mM d'ATP), a été quantifiée à l'aide d'un luminomètre (Berthold Technologies, Allemagne). Le vecteur contrôle pGL2 a été utilisé en tant que contrôle interne de la transfection.

2.10 Analyse statistique

Un test de Student non-pairé a été utilisé afin de comparer les différents groupes de résultats.

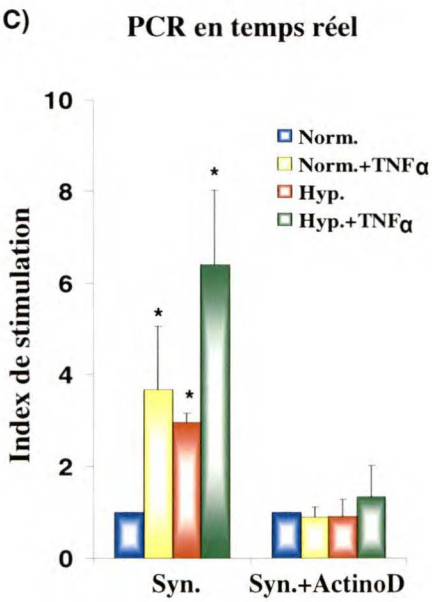
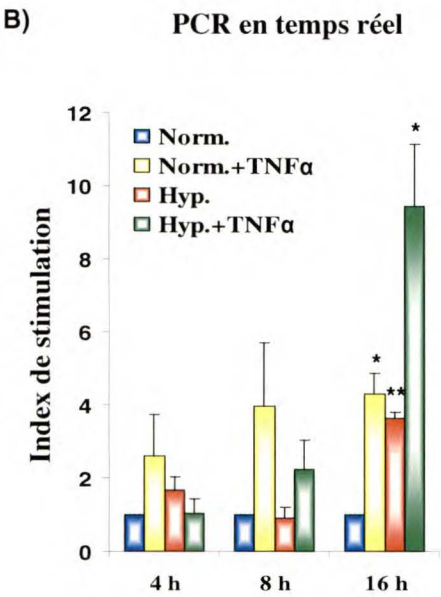
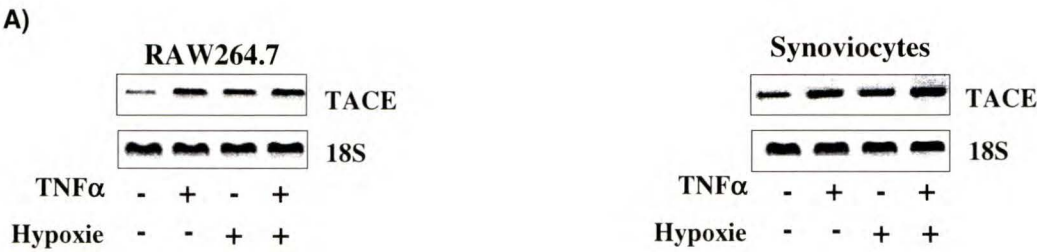
3- RÉSULTATS

3.1 Induction de l'ARN messager de la TACE par le TNF α et l'hypoxie

À ce jour, la communauté scientifique n'a réussi à identifier que très peu de stimuli capables de moduler l'expression de l'ARNm de la TACE. En fait, jusqu'à présent, seuls le VEGF et le TNF α peuvent induire faiblement, mais de façon significative, l'ARNm de cette enzyme (Bzowska et al., 2004; Majka et al., 2002). Il est connu depuis longtemps que la cytokine pro-inflammatoire TNF α est présente en grande quantité dans le microenvironnement des tumeurs et au niveau des articulations arthritiques. De plus, ces deux tissus sont caractérisés par la présence de zones hypoxiques (Peters et al., 2004). Nous avons donc voulu évaluer l'impact de ces deux stimuli inflammatoires, soit l'hypoxie et le TNF α , sur l'expression de l'ARNm de la TACE chez les deux principaux types cellulaires que l'on retrouve au niveau de la membrane synoviale. Pour ce faire, nous avons utilisé les synoviocytes, qui sont une culture primaire des synoviocytes de type B, donc de type fibroblastique tel qu'expliqué dans l'introduction de ce mémoire. Puisqu'il est impossible de conserver en culture les synoviocytes de type A (macrophages) suffisamment longtemps pour nos expériences, nous avons utilisé une lignée cellulaire macrophagique, soit les RAW264.7. Les résultats obtenus par RT-PCR et illustrés à la figure 8A démontrent que le TNF α et l'hypoxie peuvent tous deux induire l'expression de l'ARNm de la TACE chez les deux types cellulaires.

Nous avons ensuite utilisé le PCR quantitatif en temps réel afin d'étudier la cinétique de ces inductions. Tel qu'illustré à la figure 8B, l'induction de l'ARNm de la TACE par le TNF α est présente dès 4 heures de stimulation avec 20 ng/ml de TNF α et, comparativement aux

Figure 8 : Induction de l'ARNm de la TACE par le TNF α et l'hypoxie. Les synoviocytes et les cellules RAW264.7 ont été privés de sérum et stimulés avec ou sans 20 ng/ml de TNF α , en normoxie (21 % d'O $_2$) ou en hypoxie (1 % d'O $_2$). A) RT-PCR. Les cellules ont été stimulées pendant 16 heures et 2,5 μ g d'ARN ont été soumis à une transcription inverse et à une réaction de PCR tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Ces résultats sont représentatifs de 4 expériences distinctes pour chaque type cellulaire. B) PCR quantitatif en temps réel. Les synoviocytes ont été stimulés pendant 4, 8 ou 16 heures et le qRT-PCR a été effectué selon les indications de la section Matériel et méthodes. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences distinctes effectuées en duplicata. *p< 0.05, **p< 0.005, comparativement aux cellules normoxiques. C) Les synoviocytes ont été prétraités avec 20 μ g/ml d'actinomycine D, 30 minutes avant la stimulation par le TNF α et l'hypoxie. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences distinctes effectuées en duplicata. *p< 0.05, comparativement aux cellules normoxiques.



cellules non traitées, on observe une augmentation maximale de 4,3 fois à 16 heures de stimulation.

D'autre part, la réponse hypoxique est plus tardive et se manifeste à 16 heures de stimulation avec une induction de 3,6 fois par rapport aux cellules contrôles (normoxie). On observe aussi qu'à ce point de stimulation, l'hypoxie et le TNF α ont un effet additif sur l'expression de l'ARNm de la TACE pour atteindre une induction de 9,4 fois. Pour déterminer si ces effets sont régis au niveau transcriptionnel, nous avons prétraité les synoviocytes avec 20 μ g/ml d'actinomycine D, 30 minutes avant la stimulation hypoxique et la stimulation par le TNF α . L'ajout de cet inhibiteur puissant de la synthèse d'ARNm engendre une inhibition complète de l'induction de l'ARNm de la TACE régie par l'hypoxie et le TNF α (figure 8C). Ces résultats démontrent que l'expression de l'ARNm de cette protéase est régulée à la hausse par l'hypoxie et le TNF α et que des mécanismes transcriptionnels sont impliqués dans cette régulation.

3.2 Accumulation de la protéine TACE par le TNF α et l'hypoxie

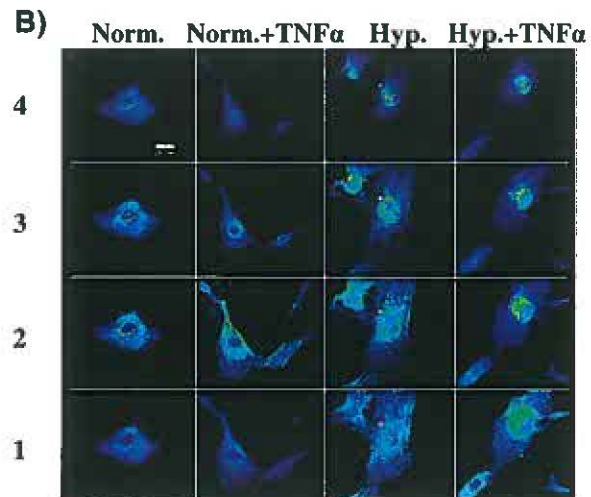
Puisqu'il a été démontré à la figure 8 qu'une diminution d'oxygène ainsi que la présence de TNF α exogène peuvent induire l'expression de l'ARNm de la TACE chez les macrophages et les synoviocytes, nous avons voulu regarder les niveaux d'expression de cette protéine chez les synoviocytes privés d'oxygène et/ou stimulés par le TNF α . À la suite d'une stimulation de 16 heures, un immunobuvardage de type Western a été effectué avec les lysats cellulaires. Les résultats, présentés à la figure 9A, démontrent que ces deux stimuli

Figure 9 : Accumulation de la protéine TACE régie par le TNF α et l'hypoxie. Les synoviocytes ont été privés de sérum et stimulés en hypoxie avec ou sans 20 ng/ml de TNF α pendant 16 heures. A) Immunobuvardage de type Western. Les lysats cellulaires et l'immunobuvardage ont été effectués tels que spécifiés dans la section Matériel et méthodes. Ce résultat est représentatif de trois expériences distinctes. B) Microscopie confocale. Les synoviocytes ont été préparés pour l'analyse par microscope confocal selon les indications fournies dans la section Matériel et méthodes. La figure illustre 4 coupes des mêmes cellules. Les lignes numéro 1, 2, 3 et 4 représentent, respectivement, une coupe transversale prise dans le premier, deuxième, troisième et quatrième quart des cellules par rapport au point d'attachement des cellules à la lame de microscope. C) Représentation tridimensionnelle pseudocolorée de la fluorescence des photos de la ligne numéro 2. Le graphique a été obtenu à l'aide du logiciel *ImageJ public domain* tel que décrit dans la section Matériel et méthodes.

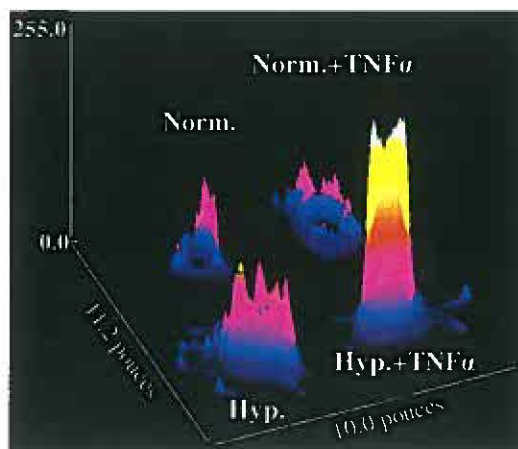
A)



B)



C)



induisent l'accumulation de la protéine TACE chez ces cellules et que leur combinaison a un effet additif sur l'expression de cette enzyme.

Il a été établi que la localisation de la TACE chez les cellules COS-7 non stimulées se situe principalement dans un compartiment périnucléaire avec une expression faible, mais significative, à la surface cellulaire et au réticulum endoplasmique (Schlondorff et al., 2000). Afin de déterminer la localisation de la TACE dans notre modèle cellulaire, nous avons effectué un marquage par immunofluorescence des synoviocytes stimulés en condition hypoxique, avec ou sans $\text{TNF}\alpha$. L'analyse par microscopie confocale révèle que la TACE est exprimée surtout dans le compartiment périnucléaire des synoviocytes avec une expression faible au niveau de la surface et du réticulum endoplasmique (figure 9B). De plus, on note que la faible tension d'oxygène ainsi que l'ajout de $\text{TNF}\alpha$ engendrent une induction de la TACE et que ces deux stimuli ont un effet additif. Le dosage de l'intensité de la fluorescence, illustré à la figure 9C, démontre bien ce phénomène. Cependant, on observe que l'effet additif de l'hypoxie et du $\text{TNF}\alpha$ sur l'expression de la TACE est plus apparent en microscopie confocale qu'au niveau de l'immunobuvardage de type Western possiblement parce que cette dernière technique est plus saturante et moins précise que le marquage par immunofluorescence. Le patron d'induction, par l'hypoxie et le $\text{TNF}\alpha$, de la TACE au niveau de la protéine corrèle donc avec les résultats obtenus pour ce qui est de l'induction de l'ARNm (figure 8).

3.3 Impact de la stimulation hypoxique et de la stimulation par le TNF α sur l'activité protéolytique de la TACE

Puisque les résultats précédents démontrent qu'une faible tension d'oxygène de même que l'ajout de TNF α induisent la production de la TACE, nous avons voulu déterminer si la TACE ainsi produite est active. Nous avons donc évalué l'impact du TNF α et de l'hypoxie sur l'activité protéolytique de la TACE envers un de ses substrats importants, soit le TNF α . Les niveaux de TNF α transmembranaire et soluble produits par les synoviocytes, transfectés de façon transitoire afin qu'ils surexpriment le TNF α , ont été évalués respectivement à partir des lysats cellulaires et des surnageants à l'aide d'un test ELISA. La figure 10 présente les résultats obtenus, exprimés sous la forme du ratio de la quantité de TNF α dans les surnageants sur la quantité de TNF α dans les lysats cellulaires. On observe que les deux stimuli induisent le relâchement du TNF α transmembranaire en TNF α soluble tel que déterminé par l'augmentation du ratio chez les synoviocytes traités à l'hypoxie et au TNF α . De plus, on note la présence d'un effet additif lorsque les deux stimuli sont combinés. Ces résultats démontrent donc que la TACE, produite sous l'effet du TNF α et de l'hypoxie, est bien active puisqu'elle a la capacité de cliver le TNF α transmembranaire.

3.4 Régulation de l'activité du promoteur de la TACE par le TNF α et l'hypoxie

La régulation de la transcription du gène de la TACE est régie par un promoteur de 2304 paires de bases situé en 5' de celui-ci. Il a été déterminé en figure 8C que l'accumulation d'ARNm de la TACE, chez les synoviocytes soumis à un traitement hypoxique et au TNF α , est dépendante de la synthèse de l'ARNm, donc de la transcription. Nous avons alors voulu savoir si l'activité du promoteur de la TACE est régulée par le TNF α ou l'hypoxie.

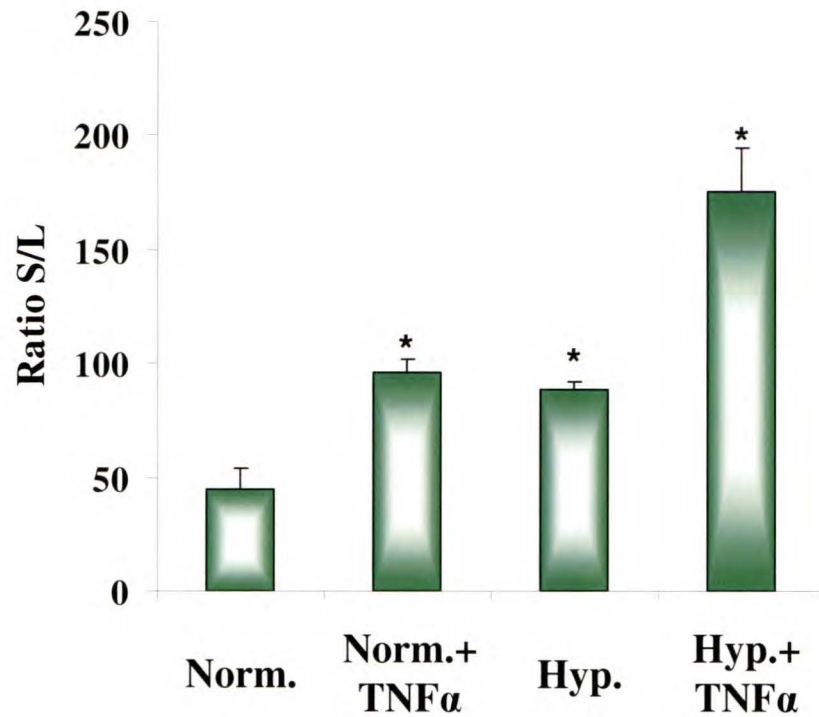


Figure 10 : Impact de la stimulation hypoxique et de la stimulation par le TNF α sur l'activité protéolytique de la TACE. Les synoviocytes ont été transfectés avec le vecteur pcDNA3-TNF humain et stimulés en condition hypoxique, avec ou sans 20 ng/ml de TNF α murin pendant 16 heures. Les surnageants et les lysats cellulaires ont été recueillis et le TNF α a été dosé par ELISA selon les indications fournies dans la section Matériel et méthodes. Les résultats représentent la moyenne des ratios de la quantité de TNF α soluble (présente dans les surnageants) sur la quantité de TNF α transmembranaire (contenue dans les lysats cellulaires) de 3 expériences distinctes. * $p < 0.05$, comparativement aux cellules normoxiques.

Le promoteur de la TACE avait déjà été cloné par le groupe de Mizui, mais malgré nos demandes répétées, ce vecteur n'a pas été rendu disponible (Mizui et al., 1999). Nous avons alors entrepris de cloner la séquence de 2304 paires de bases du promoteur de la TACE dans le vecteur d'expression de base pGL2-Luc. Cette séquence a été amplifiée par PCR à partir de l'ADN extrait de cellules RAW264.7 et insérée dans le vecteur à l'aide des sites de restriction pour les enzymes SacI et XhoI. Le séquençage du promoteur a révélé la présence de nombreuses différences entre la séquence du promoteur de la TACE clonée à partir de l'ADN de cellules RAW264.7 et celle publiée par le groupe de Mizui (figure 11). Ce groupe de chercheurs avait utilisé de l'ADN de souris C57Bl/6J afin de cloner le promoteur de la TACE tandis que les cellules RAW264.7 que nous avons utilisées provenaient de souris Balb/c.

Afin de déterminer si les différences observées entre les deux séquences sont dues à l'accumulation de mutations ponctuelles potentielles chez les cellules RAW264.7 en culture, au polymorphisme entre les deux espèces de souris ou à des erreurs techniques, nous avons recommencé le clonage mais, cette fois, en utilisant l'ADN extrait de cellules provenant de souris Balb/c ou de souris C57Bl/6J. La séquence obtenue à partir des cellules de souris Balb/c est similaire à celle obtenue à partir des cellules RAW264.7 en culture et présente donc les mêmes différences comparativement à la séquence de Mizui (résultat non illustré). D'un autre côté, la séquence obtenue à partir des cellules de souris C57Bl/6J (présentée à la figure 12) comporte très peu de différences comparativement à celle du groupe de chercheurs japonais et les rares différences restantes (seulement 4) sont probablement le résultat d'erreurs de séquençage. Nous pouvons donc confirmer que les nombreuses différences observées au niveau du promoteur de la TACE au début du clonage ne sont pas

Figure 11 : Séquence du promoteur de la TACE provenant de cellules RAW264.7. La ligne du haut représente la séquence obtenue à la suite du clonage de la séquence de 2 304 pb du promoteur de la TACE, amplifiée par PCR à partir de l'ADN extrait de cellules RAW264.7 provenant de souris Balb/c. La ligne du bas représente la séquence publiée par le groupe de Mizui. Les caractères en rouge marquent les paires de bases qui sont différentes entre les deux séquences. Les paires de base ajoutées dans notre séquence, comparativement à celle des chercheurs japonais, sont illustrées en bleu tandis que celles manquantes sont illustrées par des traits verts.

5'-GACTAAGATAAAGGCTTGTAGCCAAGTGTGATGGCCATGGCATCATCCTAGCGACAGGGAGGCTGAAGCAGGAAGGCCTGGGCAGGGTTACAAAATGAGCCT-3'
 5'-GACTAAGATAAAGGCTTGTAGCCAAGTGTGATGGCCATG CCATCATCCTAGCGACAGGGAGGCTGAAGCTGGAAGGCCTGGGCAGGGTTACAAAATGAGCCT-3'

 5'-AGCTCATAAAGCCCATCAAACCTTTTCCCCCTGCTAGGACAAATCCCCCAAAATAAACCCCTTGAGGGTCAGGCTTCGACTGTCAGTTTGGGACTCTTGATTTAAC-3'
 5'-AGCTCATAAAGCCCATCACACTTTTCCCCCTGCTAGGACAAATCCCCCAAAATAAACCCCTTGAGGGTCAGGCTTCGACTGTCAGTTTGGGACTCTTGATTTAAC-3'

 5'-ATAGCCCTGGCTGTTGTTCTGTGTGTCAGCCTCTAGTGTGGGATGGCAGGCATGGGTACACCACCAAGCTGTAGGTGCCAGTTCTGCCCTGCGGGCTTTATCCAGC-3'
 5'-ATAGCCCTGGCTGTTGTTCTGTGTGTCAGCCTCTAGTGTGGGATGGCAGGCATGGGTACACCACCAAGCTGTAGGTGCCAGTTCTGCCCTGCGGGCTTTATCCAGC-3'

 5'-ATGGCCCTCTGAGATGTTCTCTGGCTCTTCATCTCCCCAGGTGGAGTTATTTATCTCAAAGATACGGACTATTGTCAAATCAAAGATGAATTTCAAATTGGAAT-3'
 5'-ATGGCCCTCTGAGATGTTCTCTGGCTCTTCATCTCCCCAGGTGGAGTTATTTATCTCAAAGATATGGACTATTGTCAAATCAAAGATGAATTTCAAATTGGAAT-3'

 5'-CTTAATTGAATACTGACTGTGAATGTTGAAGACTACTTAAAAATGGGACTTATCCTGAAAACCTTGTTATGATAAAGTGGATCAGGAGTTTTTAAAAATTAGCA-3'
 5'-CTTAATTGAATACTGACTGTGAATGTTGAAGACTACTTAAAAATGGGACTTATCCTGAAAACCTTGTTATGATAAAGTGGATCAGGAGTTTTTAAAAATTAGCA-3'

 5'-CAGTGAAGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCCAGGACTGCCAGGACCACACACAGAAATCCTGTCTCGAAAAACAACAACAAAAACCCAAACAAAAACAGA-3'
 5'-CAGTGAAGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCCAGGACTGCCAGGACCACACACAGAAATCCTGTCTCGAAAAACAACAACAAAAACCCAAACAAAAACAGA-3'

 5'-CA - - - - CCCCCCCCCAAAAAAACCCAAACCAAAAAACCTAGCACAGTGGTACTCAACCCCTTGGGTGAGTATCCCTTTGGGGGGCGCAGGGTCCCATATC-3'
 5'-CACCCTCTCCCCCCCCAAAAAAACCCAAACCAAAAAACCTAGCACAGTGGTACTCAACCCCTTGGGTGAGTATCCCTTTGGGGGGCGCAGGGTCCCATATC-3'

 5'-AGGTACCTGCAGTTATTTACATTACCGTTTATAGCCGTAGCAAAATATAGTCATGAAGCGGCAATTAACAATTATGGTTACAGGGTCTCCACACATGAGGAAC-3'
 5'-AGGTACCTGCAGTTATTTACATTACCGTTTATAGCCGTAGCAAAATATAGTCATGAAGCGGCAATTAACAATTATGGTTACAGGGTCTCCACACATGAGGAAC-3'

 5'-GTATTAAAGGGTCCAAAGCATTAGGAAGGCTGAGTGGCACTGAAATAGCATTACTAAACATAGCTCAGCTGCACAAAAGCTAGGCGACACAAACATATAATC-3'
 5'-GTAGTA -AGGGTCCAAAGCATTAGGAAGGCTGAGTGGCACTGAAATAGCATTACTAAACATAGCTCAGCTGCACAAAAGCTAGGCGACACAAACATATAATC-3'

 5'-TGTAAGTCAACTAAGTTACAAACCTGGGGACATGGAGCCTGGACACTCAAGAGAAATATCATAGCATTCTATTATTTAAAAAG - - - - CTACCGGGCGGTGG-3'
 5'-TGCACTCAACTAAGTTACAAACCTGGGGACATGGAGCCTGGACACTCAAGAGAAATATCATAGCATTCTATTATTTAAAAAGTGGCATCTACCGGGCGGTGG-3'

 5'-TGGCGCACGCCTTTAATCCAGCACTCGGGAGGTAGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCAAGGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCCAGGACAGCCAGGGCTA-3'
 5'-TGGCGCACGCCTTTAATCCAGCACTCGGGAGGCAGAGGCAGGCGGATTTCTGAGTTCAAGGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCCA AGACAGCCAGGGTGA-3'

 5'-TACAGAGAAACCCCTGTCTCGATAAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAA - - - - CAAAAAAGCTGGCATCTAATTTGTGGGGGTGACTTT - TTTT-3'
 5'-TACAGAGAAACCCCTGTCTCGAAAAAACAAAA - - - CAAAAACAAAAACAAAAACAAAAACAAAAAAGCTGGCATCTAATTTGTGGGGGTGACTTTCTTTT-3'

 5'-TGGTTAGGTATTCCTTGAATGTGTATCTAGTGAAGTGTATATACCTCAGTTGTACAGACTAGTTTAGCTAACATGCCCCCAAAAAAATGTGCAAGTCAGTAAC-3'
 5'-TGGTTAGGTATTCCTTGAATGTGTATCTAGTGAAGTGTATATACCTCAGTTGTACAGACTAGTTTAGCTAACATGCCCCCAAAAAAATGTGCAAGTCAGTAAC-3'

 5'-TGTTGAAAAATGTTGCAAGACATTCCACAACGAACAAATTTAAATCAGTTTATCTTTTCTGGAAGACGACTTGAAATCTGACCAGGGCTATTAATGTTTCAGTATCA-3'
 5'-TGTTGAAAAATGTTGCAAGACATTCCACAACGAACAAATTTAAATCAGTTTATCTTTTCTGGAAGACGACTTGAAATCTGACCAGGGCTATTAATGTTTCAGTATCA-3'

 5'-CAAACAATAACACAGGGAAAAAAGATCGCAAAACCAAGGGGTGAGTAGGGAAACCAACTACAAGAGTTAGGGGGTAGATGGTCGCTCCTGTT-3'
 5'-CAAACAATAACACAGGGAAAAAAGATCGCAAAACCAAGGGGTGAGTAGGGAAACCAACTACAAGAGTTAGGGGGTAGATGGTCGCTCCTGTT-3'

 5'-CACTAGGAGACTGCCTAGAGTAAGGAGCCATGGAGCAAAATAAATGTCTTTGCATAAGTCTATGTACAGTCCCCCGAGCATTTTCAGTAACAACAGACCTAGTCTC-3'
 5'-CACTAGGAGACTGCCTAGAGTAAGGAACCATGGAGCAAAATAAATGTCTTTGCATAAGTCTATGTACAGTCCCCCGAGCATTTTCAGTGACAA GAGACCTAGTCTC-3'

 5'-CCGCAGCAAGTCGCC GAACAGCACACCCGATCCGCGTGGGACGATTTCCAGGGCACTGTGGCCGACTTCACGCCCATCCCAT AGGCAGGTAGTTGACTCCA-3'
 5'-CCGCAGCAAGTCGCC GAACAGCACACCCGATCCGCGTGGGCGGATCTCCAGGGCACTGTGGCCGACTTCACGCCCATCCCAT AGGCAGGTAGTTGAC CCA-3'

 5'-CGCCAGACTTCACAAACCCCTCGATAAAGACGCTGAAGGGGACTTTAATCAGGAAGAAGGTGCGACCGGTCTAAGGACCTGCCATCCTCTCCCACCTTCGTTTC-3'
 5'-CGCCAGACTTCACAGACCTTCA ATAAAGACGCTGAAGGGGACTTTAATCAGGAAGAAGGTGCGACCTGTCTAAGGACCTGCCATCCTCTCCCACCTTCGTTTC-3'

 5'-CCGCGGTACCCCGGGACAGAGGCGAGAGAGAGGGTCTGAGTCAGGACGCCGCCAGCTGAAGGCCAGGAAGGCGCCAAGCAGGC CCCAGAGGGACCAAGAA-3'
 5'-CCGCGGTACCCCGGGACAGAGGCGAGAGAGAGGGTCTGAGTCAGGACGCCGCCAGCTGAAGGCCAGGAAGGCGCCAAGCAGGC CCCAGAGGGACCAAGAA-3'

 5'-GGAACAGAGCCAGAAAGATGGCGTTCTGCCGCGCGCGCGGGGGCGGGACGAGCCACGCTCCCAATGCTCTACGGCACCTTCTTCGGGCTGTGGGCGCG-3'
 5'-GGAACAGAGCCAGAAAGATGGCGTTCTGCCGCGCGCGCGGGGGCGGGGAGCCACGCTCCCAATGCTCTACGGCACCTTCTTCGGGCTGTGGGCGCG-3'

 5'-GGGTGGTCTCCGGCTGCG GCCGGAACGAA'TTAAGCCGCTCTCAGCGAGCGCCGCTGCACTTCCGGGACGTGAGCCTAGCTTCCT GTAGCGGCGCGGGAG-3'
 5'-GGGTGGTCTCCGGCTGCG GCCGGAACGAGTTAAGCCGCTCTCAGCGAGCGCCGCTGCACTTCCGGGACGTGAGCCTAGCTTCCT GTAGCGGCGCGGGAG-3'

 5'-GGAGAAGTTTGACGGCCGTGCTGGGAAGATCACCTCCGCTCCCAATGTGAGCA GTTCCCGAACGCTCTTTCGGAGAAGGTTGCCAGAGAGGTGGTGGACGG-3'
 5'-GGAGAAGTTTGACGGCCGTGCTGGGAAGATCACCTCCGCTCCCAATGTGAGCA GTTCCCGAACGCTCTTTCGGAGAAGGTTGCCAGAGAGGTGGTGGACGG-3'

 5'-GAAC-3'
 5'-GAAC-3'

Figure 12 : Séquence du promoteur de la TACE provenant de cellules de souris C57Bl6/J. De façon analogue à la figure précédente, la séquence du promoteur de la TACE provenant de l'ADN de cellules de souris C57Bl/6J que nous avons obtenue à la suite du clonage est présentée à la ligne du haut tandis que celle publiée par le groupe de Mizui est présentée à la ligne du bas. Les caractères en rouge représentent les paires de bases différentes entre les deux séquences et le trait vert marque une paire de base manquante dans notre séquence comparativement à celle du groupe japonais.

5'-GACTAAGATAAAGGCTTGTAGCCAAGTGTGATGGCCCATGCCATCATCCTAGCGACAGGGAGGCTGAAGCTGGAAGGCCCTGGGCAGGGTTACAAAATGAGCCT-3'
 5'-GACTAAGATAAAGGCTTGTAGCCAAGTGTGATGGCCCATGCCATCATCCTAGCGACAGGGAGGCTGAAGCTGGAAGGCCCTGGGCAGGGTTACAAAATGAGCCT-3'

5'-AGCTCATAAAGCCCATCACACTTTTCCCCTGCTAGGACAAATCCCCAAAAATAAACCCCTGAGGGTCAAGGCTTCGACTGTCAGTTTGGGACTCTTGATTAAAC-3'
 5'-AGCTCATAAAGCCCATCACACTTTTCCCCTGCTAGGACAAATCCCCAAAAATAAACCCCTGAGGGTCAAGGCTTCGACTGTCAGTTTGGGACTCTTGATTAAAC-3'

5'-ATAGCCCTGGCTGTTGTTCTGTGTGTCAGCCTCCTAGTGTGGGATGGCAGGCATGGGTACACCACCAAGCTGTAGGTGCCAGTTCTGCCCTGCAGGCTTTTATCCAGC-3'
 5'-ATAGCCCTGGCTGTTGTTCTGTGTGTCAGCCTCCTAGTGTGGGATGGCAGGCATGGGTACACCACCAAGCTGTAGGTGCCAGTTCTGCCCTGCAGGCTTTTATCCAGC-3'

5'-ATGGCCCTCTGAGATGTTCTCTGGCTCTTATCTCCCCAGGTGGAGTTATTTATCCTAAAGATATGGACTATTGTCAAATCAAAGATGAATTTCAAATTGGAAT-3'
 5'-ATGGCCCTCTGAGATGTTCTCTGGCTCTTATCTCCCCAGGTGGAGTTATTTATCCTAAAGATATGGACTATTGTCAAATCAAAGATGAATTTCAAATTGGAAT-3'

5'-CTTAATTGAATACTGACTTGTGAATGTTGAAGACTACTTAAATTTGGGACTTATCCTGAAAACTTGTATGATAAAGTGGATCAGGAGTTTAAAAAATTAGCA-3'
 5'-CTTAATTGAATACTGACTTGTGAATGTTGAAGACTACTTAAATTTGGGACTTATCCTGAAAACTTGTATGATAAAGTGGATCAGGAGTTTAAAAAATTAGCA-3'

5'-CAGTGAAGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCAGGACTGCCAGGACCACACAGAAATTCCTGTCTCGAAAAACAACAACAAAAACCCAAACAAAAACAGA-3'
 5'-CAGTGAAGCCAGCCTGGTCTACAGAGTGAGTTCAGGACTGCCAGGACCACACAGAAATTCCTGTCTCGAAAAACAACAACAAAAACCCAAACAAAAACAGA-3'

5'-CACCCCTCCCCCCCCAAAAAAACCCAAACAAACAAAAACCTAGCACAGTGGTACTCAACCCCTTGGGTCAAGTATCCCTTTGGGGGTGTCAGGGTCCCATATC-3'
 5'-CACCCCTCCCCCCCCAAAAAAACCCAAACAAACAAAAACCTAGCACAGTGGTACTCAACCCCTTGGGTCAAGTATCCCTTTGGGGGTGTCAGGGTCCCATATC-3'

5'-AGGTACCCCTGCAGTTATTTACATTACCGTTTATAGCCGTAGCAAAATATAGTCATGAAGCTGCAATTAACAATTATGGTTTCAGGGTCTCCACACATGAGGAAT-3'
 5'-AGGTACCCCTGCAGTTATTTACATTACCGTTTATAGCCGTAGCAAAATATAGTCATGAAGCTGCAATTAACAATTATGGTTTCAGGGTCTCCACACATGAGGAAT-3'

5'-GTAGTAAGGGTCCAAAGCATTAGGAAGGCTGAGTGCCACTGAAATAGCATTTACTAAACATAGCTCAGCTGCACAAAAGCTAGGCGACACAAACAATATAATC-3'
 5'-GTAGTAAGGGTCCAAAGCATTAGGAAGGCTGAGTGCCACTGAAATAGCATTTACTAAACATAGCTCAGCTGCACAAAAGCTAGGCGACACAAACAATATAATC-3'

5'-TGCAGTCAACTAAAGTTACAAACCTGGGGACATGGAGCCTGGACACTCAAGAGAAATATCATAGCATTTCTATTATTAAGTGGCATCTACCGGGCGGTGG-3'
 5'-TGCAGTCAACTAAAGTTACAAACCTGGGGACATGGAGCCTGGACACTCAAGAGAAATATCATAGCATTTCTATTATTAAGTGGCATCTACCGGGCGGTGG-3'

5'-TGGCGCACGCCTTTAATCCAGCACTCGGGAGGCAGAGGCAGGCGGATTTCGTAGTTCAAGGCCAGCCTGGCCTACAGAGTGAGTTCCAAGACAGCCAGGGTTA-3'
 5'-TGGCGCACGCCTTTAATCCAGCACTCGGGAGGCAGAGGCAGGCGGATTTCGTAGTTCAAGGCCAGCCTGGCCTACAGAGTGAGTTCCAAGACAGCCAGGGTTA-3'

5'-TACAGAGAAACCTGTCTCGAAAAAAACAAACAAAAACAAACAAAAACAAACAAAAACAAACAAAAAGCTGGCATCTAATTTGTGGGGGTGACTTT - TTTT-3'
 5'-TACAGAGAAACCTGTCTCGAAAAAAACAAACAAAAACAAACAAAAACAAACAAAAACAAACAAAAAGCTGGCATCTAATTTGTGGGGGTGACTTTCTTTT-3'

5'-TGGTTAGGTATTCCTTGAATGTGTACCTAGTGAAAGTGTTTATACCTCAGTTGTACAGACTAGTTTAGCTAACATGCCCCCCAAAAAATGTGCAAGTCAGTAAC-3'
 5'-TGGTTAGGTATTCCTTGAATGTGTACCTAGTGAAAGTGTTTATACCTCAGTTGTACAGACTAGTTTAGCTAACATGCCCCCCAAAAAATGTGCAAGTCAGTAAC-3'

5'-TGTTGAAAATGTTGCAAGACATTCCACAACGAACAAATTTAAATCAGTTTATCTTTTCTGGAAGACGACTTGAATCTGACCAGGGCTATTAATGTTTCAGTATCA-3'
 5'-TGTTGAAAATGTTGCAAGACATTCCACAACGAACAAATTTAAATCAGTTTATCTTTTCTGGAAGACGACTTGAATCTGACCAGGGCTATTAATGTTTCAGTATCA-3'

5'-CCAACAATAACACAGGGAAGAAAAAAGGCCGCAAAACCAAGGGGTGAGTAGGGAACCAACTACAAGAGTTAGGGGGTAGATGGTCGCTCCTGTT-3'
 5'-CAAACAATAACACAGGGAAGAAAAAAGGCCGCAAAACCAAGGGGTGAGTAGGGAACCAACTACAAGAGTTAGGGGGTAGATGGTCGCTCCTGTT-3'

5'-CACTAGGAGACTGCCTAGAGTAAGGAACCATGGAGCAATAAATGTCTTTGCATAAGTCTATGTACAGTCCCTGAGCATTTTCAGTGACAAGAGACCTAGTCTC-3'
 5'-CACTAGGAGACTGCCTAGAGTAAGGAACCATGGAGCAATAAATGTCTTTGCATAAGTCTATGTACAGTCCCTGAGCATTTTCAGTGACAAGAGACCTAGTCTC-3'

5'-CCGCAGCAAGTCGCC GAACAGCACACCCGATCCGCGTGGGGCGGATCTCCAGGGCACTGTGGCCGACTTCACGCCCCATCCCAT AGGCAGGTAGTTGACCCCA-3'
 5'-CCGCAGCAAGTCGCC GAACAGCACACCCGATCCGCGTGGGGCGGATCTCCAGGGCACTGTGGCCGACTTCACGCCCCATCCCAT AGGCAGGTAGTTGACCCCA-3'

5'-CGCCAGACTTCACAGACCTTCAATAAAGACGCTGAAGGGGACTTTAATCACGAAGAAGGTGCGACCTGTCTAAGGACCTGCCATCCTCTCCACCTTCGTT-CC-3'
 5'-CGCCAGACTTCACAGACCTTCAATAAAGACGCTGAAGGGGACTTTAATCACGAAGAAGGTGCGACCTGTCTAAGGACCTGCCATCCTCTCCACCTTCGTTTCC-3'

5'-CCGCGGTACCCGGGGACAGAGGCGAGAGAGAGAGGGTTCGAGTCAAGACGCCGCCAGCTGAAGGCCAGGAAGGCGCCAAGCAGGC CCCAGAGGGACCAGGAA-3'
 5'-CCGCGGTACCCGGGGACAGAGGCGAGAGAGAGAGGGTTCGAGTCAAGACGCCGCCAGCTGAAGGCCAGGAAGGCGCCAAGCAGGC CCCAGAGGGACCAGGAA-3'

5'-GGAACAGAGCCCAAGATGGCGTTCTGCCGGCGCGCGCGGGGGCGGGGAGGCCACGCTCCCAATGCTCTACGGCACCTTCTTCCGGCTGTGGGCGCG-3'
 5'-GGAACAGAGCCCAAGATGGCGTTCTGCCGGCGCGCGCGGGGGCGGGGAGGCCACGCTCCCAATGCTCTACGGCACCTTCTTCCGGCTGTGGGCGCG-3'

5'-GGGTGGTCTCCGGTTCG GCGGAAACGAGTTAAGCCGCTCTCAGCGAGCGCCGCTGCAGTTCCGGGGACGTGAGCCTAGCTTCCT GTAGGCGCGCGGGAG-3'
 5'-GGGTGGTCTCCGGTTCG GCGGAAACGAGTTAAGCCGCTCTCAGCGAGCGCCGCTGCAGTTCCGGGGACGTGAGCCTAGCTTCCT GTAGGCGCGCGGGAG-3'

5'-GGAGAAGTTTGAGGGCCGTGCTGGGAAGATCACCTCCGCTCCCAATGTGAGCA GTTCCCGAACGCTCTTCGGAGAAGGTTTCCAGAGAGGTGGTGGACGG-3'
 5'-GGAGAAGTTTGAGGGCCGTGCTGGGAAGATCACCTCCGCTCCCAATGTGAGCA GTTCCCGAACGCTCTTCGGAGAAGGTTTCCAGAGAGGTGGTGGACGG-3'

5'-GAAC-3'
 5'-GAAC-3'

le résultat de mutations ponctuelles survenues chez les cellules RAW264.7 en culture puisqu'elles sont aussi présentes chez les cellules de souris Balb/c. Nous concluons donc qu'il existe du polymorphisme au niveau de ce promoteur entre les souris Balb/c et C57Bl/6J. Les expériences subséquentes ont été réalisées à l'aide du vecteur contenant la séquence du promoteur de la TACE provenant des cellules de souris C57Bl/6J (pTACE-Luc). Une représentation schématique de ce vecteur est illustrée à la figure 13.

Les synoviocytes ont ensuite été transfectés de façon transitoire avec le vecteur pTACE-Luc ou avec le vecteur de base pGL2-Luc utilisé en tant que contrôle de transfection. À la suite de l'incubation de 16 heures, des cellules transfectées, avec 0, 2 ou 20 ng/ml de TNF α en condition normoxique ou hypoxique, nous avons mesuré l'activité luciférase résultante. La figure 13 démontre que le TNF α utilisé en condition normoxique induit l'activité du promoteur de la TACE de façon concentration dépendante pour atteindre un index de stimulation de 2,6. On observe également que l'induction de l'activité luciférase par l'hypoxie est similaire à celle obtenue avec la plus grande concentration de TNF α utilisée, soit 20 ng/mL. De plus, on note un effet additif du TNF α et de l'hypoxie pour atteindre un index de stimulation de 4,4 comparativement aux cellules non traitées. Nous pouvons donc conclure que, de façon analogue aux résultats obtenus aux niveaux de l'ARNm et de la protéine, la stimulation hypoxique des synoviocytes, avec ou sans TNF α , engendre une induction de l'activité du promoteur de la TACE et que ces deux stimuli ont un effet additif.

3.5 Accumulation du facteur de transcription HIF-1 bioactif

L'hypoxie induit l'expression de plusieurs facteurs de transcription tels que le ETS-1, le NF- κ B et le HIF-1 (Koong et al., 1994; Oikawa et al., 2001; Wang et al., 1995). Ce dernier est

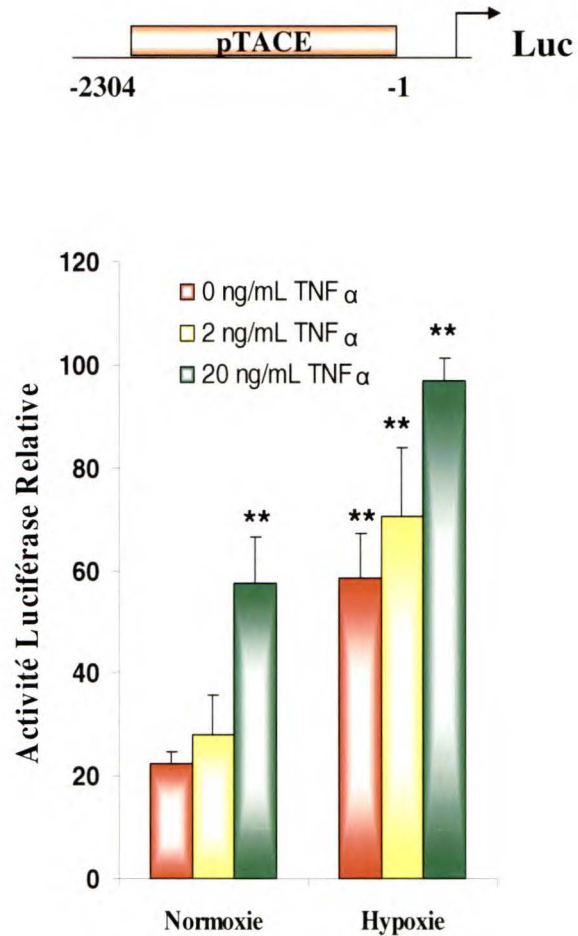


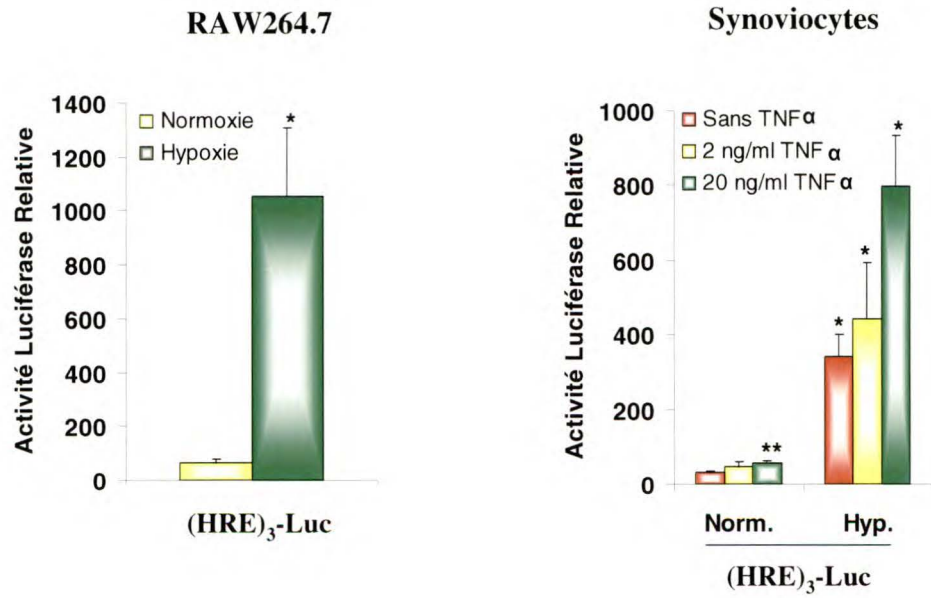
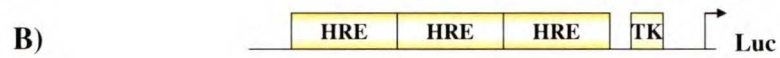
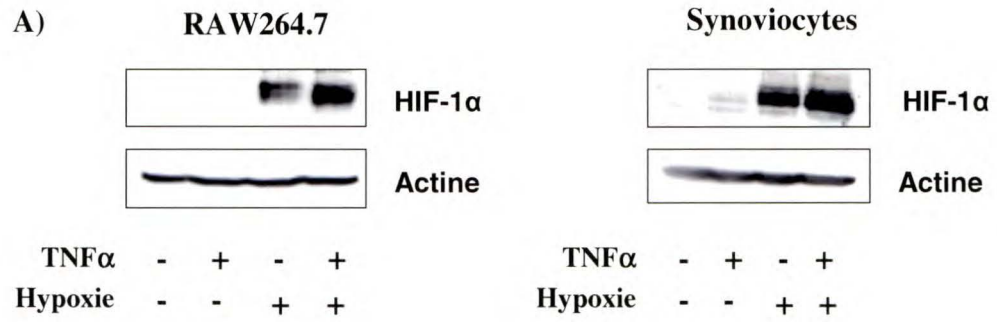
Figure 13 : Stimulation de l'activité du promoteur de la TACE par le TNF α et l'hypoxie. Les synoviocytes ont été transfectés, privés de sérum et stimulés par le TNF α (0, 2 ou 20 ng/ml) pendant 16 heures dans un environnement normoxique ou hypoxique. L'activité luciférase a été évaluée tel que mentionné dans la section Matériel et méthodes. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences distinctes effectuées en duplicata. **p< 0.005, comparativement aux cellules normoxiques.

le facteur de transcription induit en hypoxie le mieux étudié. Il a été démontré récemment qu'il est impliqué dans la réponse inflammatoire (Cramer et al., 2003). De plus, il est connu que le TNF α peut induire l'accumulation nucléaire et l'activité du HIF-1 α , la sous-unité régulable du complexe HIF-1 (Haddad et Land, 2001; Hellwig-Burgel et al., 1999; Sandau et al., 2001). Nous avons donc voulu déterminer si nos deux modèles cellulaires, soit les synoviocytes et les RAW264.7, peuvent répondre au traitement par l'hypoxie et le TNF α par l'augmentation de la quantité de protéine et de l'activité du HIF-1.

Premièrement, nous avons évalué le niveau d'expression du HIF-1 α par immunobuvardage de type Western des extraits nucléaires préparés à partir des deux types de cellules (figure 14A). Chez les synoviocytes, le TNF α et l'hypoxie induisent tous deux l'accumulation du HIF-1 α au noyau avec un effet additif des deux stimuli. Par ailleurs, chez les cellules RAW264.7, on peut observer l'effet du TNF α seulement en condition hypoxique. Ce phénomène est probablement attribuable au fait que la technique d'immunobuvardage de type Western n'est pas suffisamment sensible pour détecter la quantité faible de HIF-1 α induite par le TNF α en normoxie. Pour cette figure, nous avons utilisé l'actine comme contrôle puisque l'histone, normalement utilisée pour les protéines nucléaires, n'apparaissait pas sur ces immunobuvardages en raison de son faible poids moléculaire. De plus, la présence de l'actine au niveau du noyau a déjà été établie (Bettinger et al., 2004; Pederson et Aebi, 2002) et, conséquemment, cette protéine est donc aussi acceptée comme contrôle pour les protéines nucléaires.

Ensuite, nous avons effectué des essais luciférase pour déterminer si le HIF-1 α produit dans ces conditions est fonctionnellement actif. Nous avons donc transfecté, chez les

Figure 14 : Production du HIF-1 fonctionnel suite au traitement par le TNF α et l'hypoxie. A) Immunobuvardage de type Western. Les cellules RAW264.7 et les synoviocytes ont été privés de sérum et stimulés en condition hypoxique avec ou sans 20 ng/ml de TNF α . Les extraits nucléaires et l'immunobuvardage ont été préparés tels que décrits dans la section Matériel et méthodes. Ces résultats sont représentatifs de deux expériences distinctes pour chaque type cellulaire. B) L'activité luciférase a été évaluée selon les indications des procédures expérimentales suite à la transfection et la stimulation des cellules pendant 16 heures en hypoxie avec, pour les synoviocytes, 0, 2 ou 20 ng/ml de TNF α . Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences distinctes, pour chaque type cellulaire, effectuées en duplicata. *p< 0.05, **p< 0.005, comparativement aux cellules normoxiques.



synoviocytes et les macrophages, le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur de base de la thymidine kinase. L'activité de ce promoteur est régie par trois répétitions de la séquence HRE (*hypoxia-responsive element*) qui représente le site de liaison au HIF-1 du gène de l'érythropoïétine (figure 14B).

Tel qu'illustré à la figure 14B, l'activité luciférase est augmentée à de hauts niveaux chez les deux types de cellules lorsqu'elles sont privées d'oxygène (un index de stimulation de 16,5 pour les cellules RAW264.7 et de 10,4 pour les synoviocytes comparativement aux cellules normoxiques). De plus, le traitement au TNF α des synoviocytes occasionne une induction de 1,7 comparativement aux cellules normoxiques et de 2,3 comparativement aux cellules hypoxiques de l'activité luciférase régie par la liaison du HIF-1 à ses sites HRE. Ces résultats indiquent que l'hypoxie et le TNF α induisent l'accumulation nucléaire du HIF-1 α et que le HIF-1 ainsi formé active efficacement les éléments de réponse *cis*-HRE.

3.6 Identification des segments du promoteur de la TACE impliqués dans la régulation hypoxique

L'analyse de la séquence du promoteur de la TACE a révélé la présence de six sites putatifs de liaison pour le facteur de transcription HIF-1. Quatre de ces sites sont composés de la séquence minimale de liaison au HIF-1, qui est le HBS (*hypoxia binding sequence*), et les deux autres sites sont formés des séquences HBS et HAS (*HIF-1 ancillary sequence*), composant ainsi la séquence optimale de liaison pour ce facteur de transcription (figure 15A). La présence de ces sites est une caractéristique commune des gènes régulés par le HIF-1 ce qui suggère que ce facteur de transcription pourrait réguler l'activité du promoteur de la TACE. Afin d'identifier les régions de ce promoteur impliquées dans la réponse

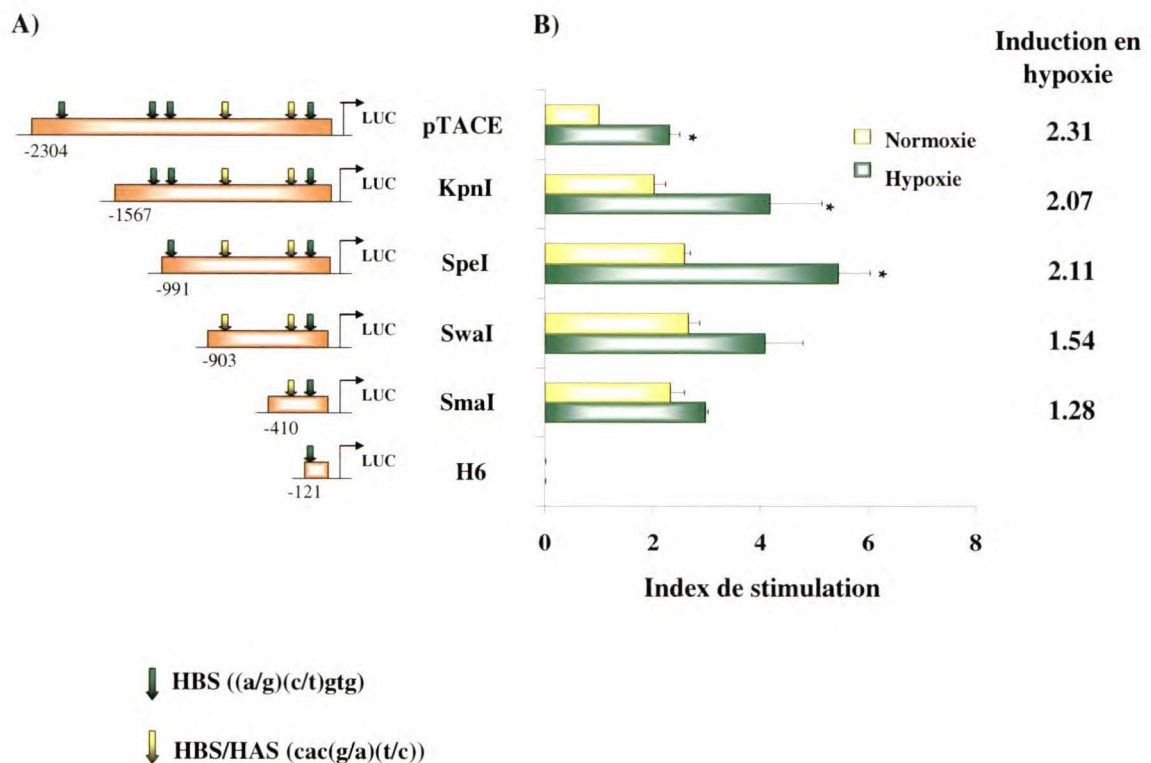


Figure 15 : Identification des segments du promoteur de la TACE impliqués dans l'induction de son activité en hypoxie. A) Représentation schématique des vecteurs délétants où la position des six sites putatifs de liaison pour le HIF-1 est illustrée par des flèches. B) Essais luciférase. Les synoviocytes ont été transfectés, privés de sérum et stimulés pendant 16 heures en condition hypoxique. L'activité luciférase a été évaluée tel que mentionné dans la section Matériel et méthodes. Les résultats représentent la moyenne de 4 expériences distinctes effectuées en duplicata. * $p < 0.05$, comparativement aux cellules normoxiques.

hypoxique, nous avons tout d'abord effectué des délétions en 5' du vecteur pTACE-Luc et nous les avons utilisés en essais luciférase pour évaluer l'impact de ces délétions sur l'activité du promoteur.

Les résultats de la figure 15B démontrent que l'induction de l'activité du promoteur de la TACE par l'hypoxie est maintenue même lorsque la délétion atteint la position -991 pb. En effet, ces délétants produisent une activité luciférase comparable au vecteur pTACE-Luc entier transfecté chez des synoviocytes soumis à une faible tension d'oxygène. Par contre, lorsque la section -991 à -903 pb du promoteur est absente, on assiste à une inhibition de 59 % de la réponse hypoxique et à une inhibition de 79 % lorsque la délétion atteint la position -410 pb. Nous pouvons donc conclure que la section du promoteur située entre -991 et -410 pb, contenant deux sites de liaison putatifs pour le HIF-1, est importante pour l'induction de l'activité du promoteur de la TACE lors d'une diminution d'oxygène.

3.7 Importance du HIF-1 dans la régulation du promoteur de la TACE

Tel que mentionné précédemment, le HIF-1 est un facteur de transcription important induit dans un environnement hypoxique et il est connu pour être responsable de la régulation de nombreux gènes. De plus, nous avons démontré, à la figure 15, que le segment -991 à -410 pb du promoteur de la TACE, contenant deux sites de liaison putatifs pour le HIF-1, est nécessaire pour la régulation hypoxique de ce promoteur. Donc, afin de déterminer si l'induction de l'activité du promoteur de la TACE par l'hypoxie est directement régie par le HIF-1, la construction pTACE-Luc a été co-transfectée chez les synoviocytes avec les vecteurs encodant les gènes pour le HIF-1 α et le HIF-1 β , ou avec le vecteur contrôle pcDNA3. Suite à la privation d'oxygène des cellules pendant 16 heures, l'activité luciférase

a été évaluée. Les résultats présentés à la figure 16A démontrent que le HIF-1 exogène stimule l'activité du promoteur de la TACE à des niveaux significativement plus élevés que ceux obtenus pour les cellules contrôles et ce tant en normoxie qu'en hypoxie.

Puisque le HIF-1 induit l'activité du promoteur de la TACE et que nous avons démontré précédemment que le fragment de ce promoteur, important pour sa régulation hypoxique, présente deux sites potentiels de liaison au HIF-1, nous avons voulu savoir si ces deux sites sont requis pour l'induction de l'activité de ce promoteur par l'hypoxie. Pour ce faire, nous avons muté les deux séquences des sites putatifs H3 et H4 de façon à ce que le HIF-1 ne puisse plus se lier à ces deux sites. Ces mutations ont résulté en deux mutants simples, où seulement H3 ou H4 ont été mutés, et un mutant double, des deux sites H3 et H4. Ces vecteurs ont été utilisés pour des essais luciférase chez les synoviocytes tel que décrit précédemment.

Comme le démontre les résultats de la figure 16B, nous avons obtenu un index de stimulation de 2,7 pour la luciférase produite par les synoviocytes transfectés avec le vecteur pTACE-Luc de type sauvage et incubés dans une chambre en hypoxie. Par contre, l'induction hypoxique de l'activité du promoteur de la TACE est réduite de 50 %, lorsque le site H3 est muté, et de 76 %, lors d'une mutation sur le site H4. De plus, la mutation combinée des deux sites H3 et H4 entraîne une diminution de l'activité de ce promoteur en condition hypoxique à des niveaux semblables au niveau de base obtenu en normoxie. L'ensemble des résultats présentés à la figure 16 suggère donc que le HIF-1 est un joueur capital pour la régulation de l'activité du promoteur de la TACE dans un environnement faible en oxygène. Ils indiquent aussi que les sites de liaison H3 et H4 sont importants pour

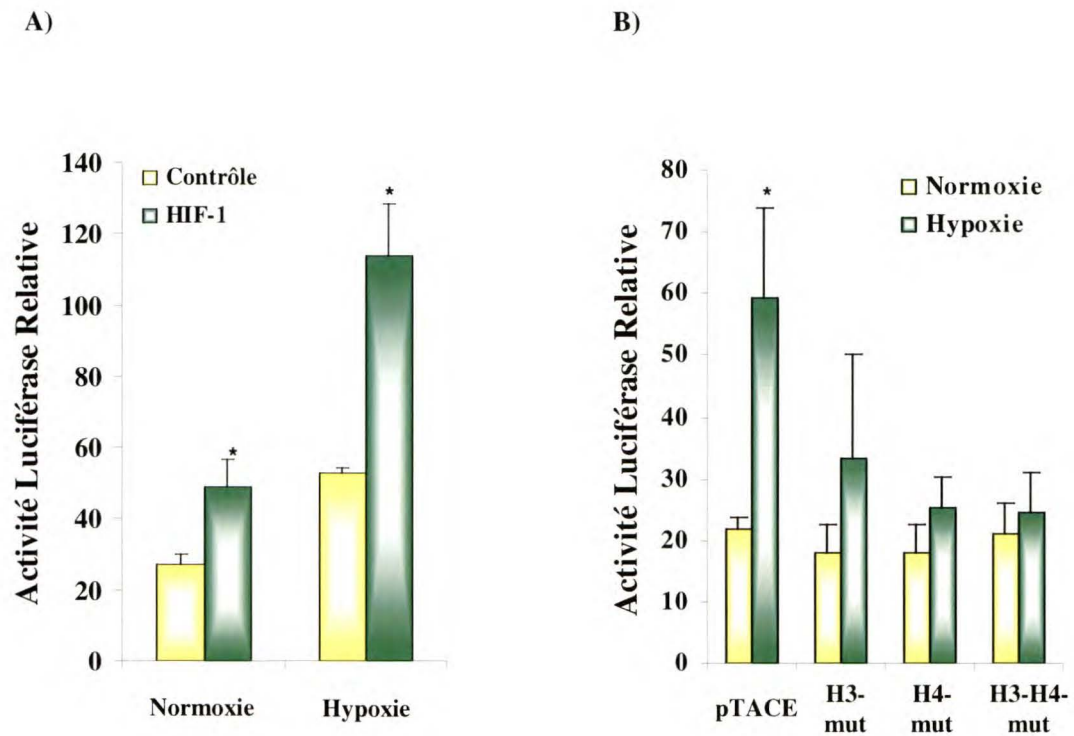


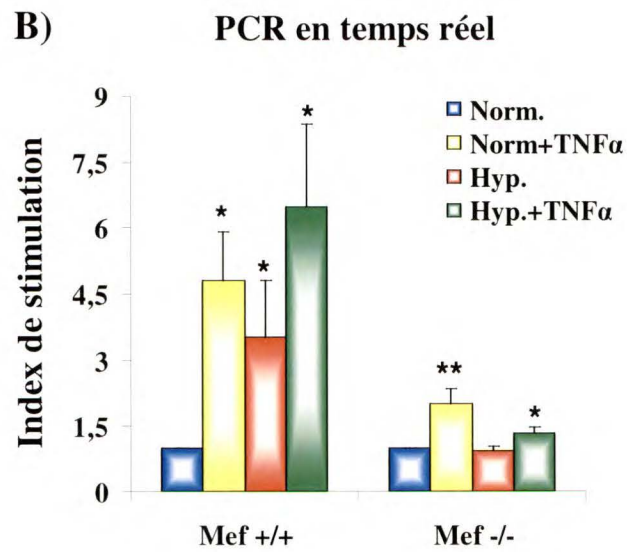
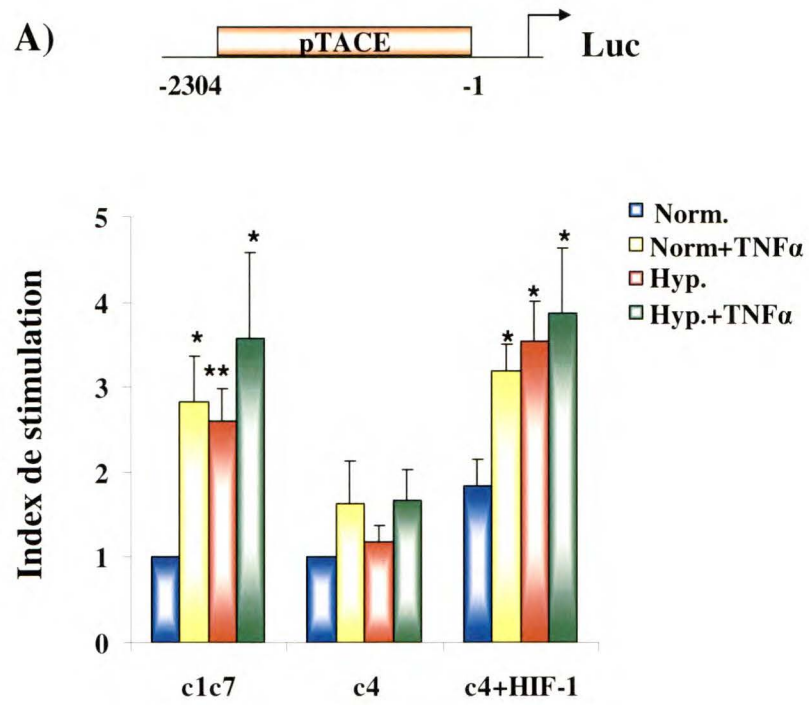
Figure 16 : Importance du facteur de transcription HIF-1 pour l'induction de l'activité du promoteur de la TACE en condition hypoxique. Les synoviocytes ont été transfectés, privés de sérum et stimulés en hypoxie pendant 16 heures. L'activité luciférase a été déterminée selon les indications des procédures expérimentales. A) Co-transfection du vecteur pTACE-Luc avec les vecteurs pcDNA3-HIF-1 α et pcDNA3-HIF-1 β , ou avec le vecteur contrôle pcDNA3. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences distinctes effectuées en duplicata. * $p < 0.05$, comparativement aux cellules transfectées avec le vecteur contrôle. B) Transfection du vecteur pTACE-Luc ou des vecteurs mutés. Les résultats représentent la moyenne de 4 expériences distinctes effectuées en duplicata. * $p < 0.05$, comparativement aux cellules normoxiques.

cette activation transcriptionnelle. Puisque la mutation combinée des deux séquences résulte en une inhibition de l'activité du promoteur similaire à celle obtenue par la mutation du site H4 seulement, le site H4 est probablement le site de liaison principalement utilisé par le HIF-1.

Afin de confirmer l'implication du HIF-1 endogène dans la régulation du gène de la TACE, nous avons utilisé deux modèles cellulaires qui ne produisent pas de HIF-1 fonctionnel. Le premier système cellulaire utilisé est composé des lignées cellulaires d'hépatome Hepa-1 c1c7 et Hepa-1 c4. Cette dernière, dérivée des cellules de type sauvage Hepa-1 c1c7, comporte une mutation sur le gène encodant le HIF-1 β inhibant ainsi la formation du complexe HIF-1 fonctionnel. Ensuite, nous avons utilisé les fibroblastes de souris embryonnaires de type sauvage (MEF) ainsi que les cellules MEF déficientes en HIF-1 fonctionnel (MEF-/-). Celles-ci présentent une mutation sur le gène encodant le HIF-1 α , empêchant la formation de l'hétérodimère avec le HIF-1 β .

Tout d'abord, nous avons transfecté le vecteur pTACE-Luc chez les cellules Hepa-1 c1c7 et Hepa-1 c4 afin d'évaluer l'impact de la stimulation de ces cellules dans un environnement faible en oxygène avec ou sans TNF α sur l'activité du promoteur de la TACE. On observe que l'activité de ce promoteur est induite chez les cellules de type sauvage soumises au traitement hypoxique avec ou sans TNF α (figure 17A). Cependant, en l'absence de HIF-1 β , l'induction hypoxique est complètement inhibée tandis que l'induction régie par le TNF α n'est que partiellement diminuée. De plus, la complémentation des cellules déficientes en HIF-1 avec du HIF-1 β fonctionnel ramène l'induction, régie par l'hypoxie et le TNF α , de l'activité du promoteur à des niveaux semblables à ceux obtenus chez les cellules de type

Figure 17 : Inhibition de l'induction de l'activité du promoteur et de l'ARNm de la TACE en l'absence de HIF-1 fonctionnel. A) Les cellules Hepa-1 c1c7 et Hepa-1 c4 ont été transfectées, privées de sérum et stimulées en condition hypoxique avec ou sans 20 ng/ml de TNF α pendant 16 heures. La lecture de l'activité luciférase a été prise selon les indications des procédures expérimentales. Les résultats représentent la moyenne de 4 expériences distinctes effectuées en duplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, comparativement aux cellules normoxiques. B) Les cellules MEF de type sauvage et celles déficientes en HIF-1 α ont été privées de sérum, stimulées pendant 16 heures en hypoxie, avec ou sans 20 ng/ml de TNF α . L'ARN a ensuite été extrait, soumis à une transcription inverse et le PCR quantitatif en temps réel a été effectué tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les résultats représentent la moyenne de 4 expériences distinctes effectuées en duplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, comparativement aux cellules normoxiques.



sauvage. Nous pouvons donc conclure que le HIF-1 est essentiel à l'induction de l'activité du promoteur de la TACE par l'hypoxie tandis qu'il est requis seulement en partie par le TNF α afin de réguler cette activité.

Ensuite, nous avons regardé les niveaux d'ARNm de la TACE produits par les fibroblastes de souris embryonnaires (MEF) lors d'une stimulation par le TNF α et/ou par l'hypoxie. À l'aide du PCR quantitatif en temps réel, nous avons déterminé que les deux stimuli induisent la production d'ARNm chez les cellules de type sauvage et, de façon similaire aux résultats obtenus chez les synoviocytes (figure 8C), on note un effet additif lorsqu'ils sont combinés. Par contre, on obtient des résultats différents pour les MEF déficientes en HIF-1 fonctionnel. Chez ces cellules, l'induction hypoxique de l'ARNm est complètement inhibée tandis que le TNF α induit encore l'accumulation d'ARNm mais à un niveau plus faible que chez les cellules de type sauvage. Ces résultats, présentés à la figure 17B, indiquent que la régulation de la production de l'ARNm de la TACE par l'hypoxie est entièrement dépendante du HIF-1 tandis que le TNF α requiert partiellement ce facteur de transcription afin d'exercer ses effets inducteurs. Ces résultats corréleront donc avec ceux obtenus au niveau de l'activité du promoteur (figure 17A).

3.8 Implication du facteur de transcription NF- κ B dans la régulation du promoteur de la TACE par le TNF α

La voie de signalisation principale du TNF α est via l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Puisqu'il a été démontré à la figure 17 que la régulation du gène de la TACE par le TNF α est partiellement dépendante du HIF-1, nous avons voulu savoir si une autre voie de

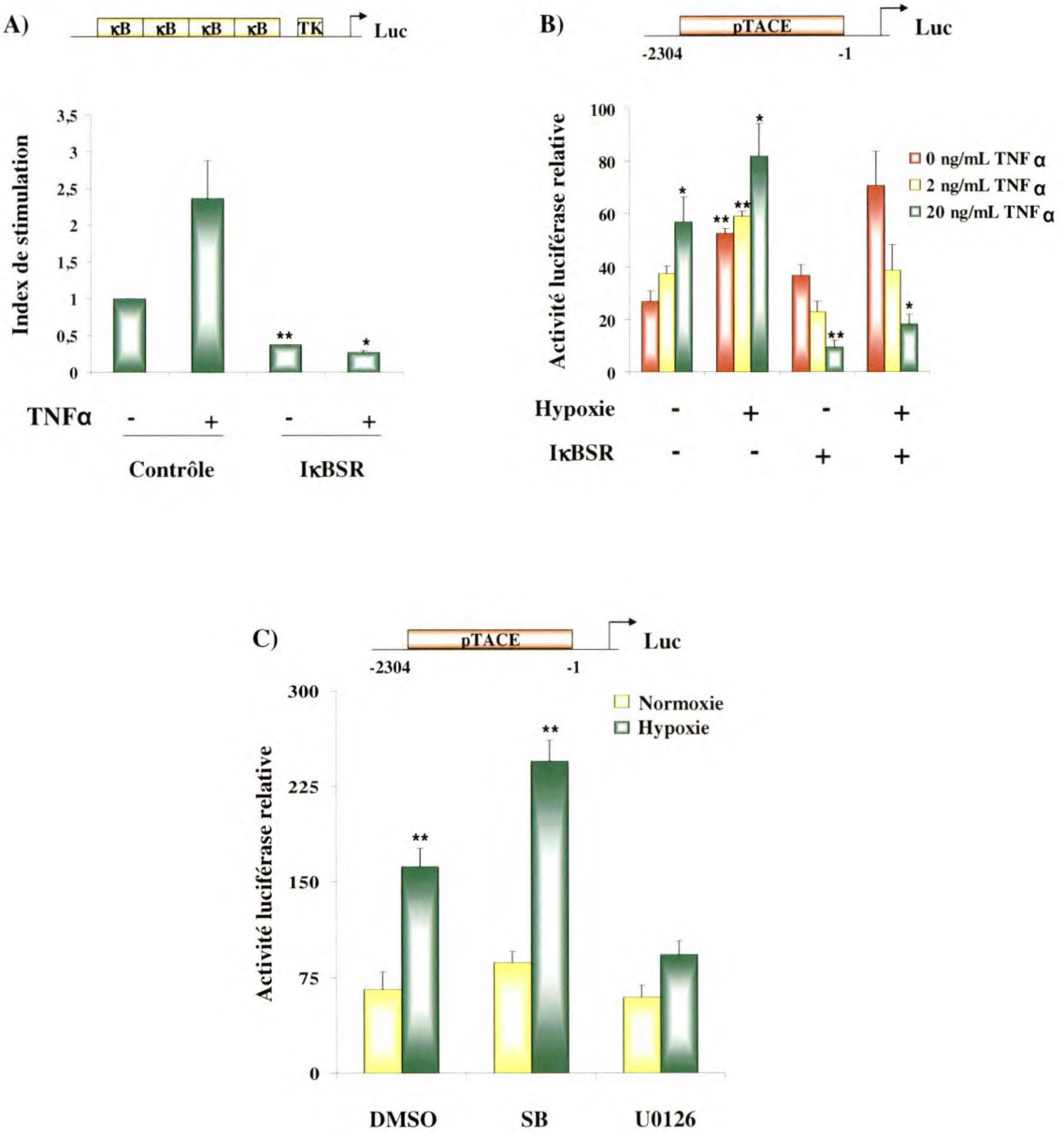
signalisation, telle que le NF- κ B, pouvait être impliquée dans le mécanisme de régulation de l'activité du promoteur de la TACE par le TNF α . Pour ce faire, nous avons utilisé un vecteur encodant le gène d'un super répresseur de la voie du NF- κ B, soit le I κ B (I κ BSR). Ce gène est muté de sorte que la protéine résultante ne peut pas être phosphorylée et dégradée. Elle garde donc le facteur de transcription NF- κ B sous une forme inactive au niveau du cytoplasme.

Afin de nous assurer de la fonctionnalité du I κ BSR, les synoviocytes ont été co-transfectés avec le vecteur encodant le I κ BSR, ou le vecteur contrôle, en présence du vecteur pNF κ B-Luc. Ce dernier est composé du gène encodant la luciférase sous le contrôle d'un promoteur de base de la thymidine kinase. L'activité de ce promoteur est régie par 4 séquences de liaison pour le NF- κ B. Une représentation schématique de cette construction est présentée à la figure 18A. Après la stimulation des synoviocytes par le TNF α , on assiste à une induction de la luciférase produite chez les cellules co-transfectées avec le vecteur contrôle. Par contre, chez les cellules exprimant le I κ BSR, cette induction est inhibée à un niveau inférieur aux niveaux de base, et ce, tant chez les cellules non stimulées que chez les cellules ayant reçue du TNF α . Les résultats présentés à la figure 18A confirment donc l'activité répressive du I κ BSR sur l'activité du NF- κ B.

Le I κ BSR a donc été utilisé en co-transfection avec le vecteur pTACE-Luc chez les synoviocytes, stimulés par l'hypoxie et/ou le TNF α . Tel qu'illustré à la figure 18B, on obtient, chez les cellules transfectées avec le vecteur contrôle, une induction de l'activité du promoteur de la TACE en condition hypoxique et lorsque ces cellules sont stimulées avec le

Figure 18 : Implication du facteur de transcription NF- κ B dans la régulation du promoteur de la TACE par le TNF α . A) Les synoviocytes ont été co-transfectés avec les vecteurs pNF κ B-Luc et IkBSR, ou avec le vecteur contrôle pcDNA3. Ils ont ensuite été stimulés pendant 16 heures avec 20 ng/ml de TNF α . Les résultats représentent la moyenne de 2 expériences distinctes effectuées en duplicata. B) Les synoviocytes ont été co-transfectés avec les vecteurs pTACE-Luc et IkBSR, ou avec le vecteur contrôle pcDNA3, privés de sérum et stimulés pendant 16 heures avec 0, 2 ou 20 ng/ml de TNF α en condition normoxique ou hypoxique. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences distinctes effectuées en duplicata. C) Les synoviocytes ont été transfectés avec le vecteur pTACE-Luc, privés de sérum et stimulés en hypoxie avec 5 μ M de SB202190 ou de U0126 ou avec le véhicule DMSO en tant que contrôle négatif. Les résultats représentent la moyenne de 3 expériences distinctes effectuées en duplicata. Pour les 3 graphiques de cette figure, la lecture de l'activité luciférase a été effectuée selon les indications fournies précédemment.

*p< 0.05, **p< 0.005, comparativement aux cellules normoxiques.



TNF α , ce qui est cohérent avec les résultats présentés à la figure 13B. L'inhibition du NF- κ B ne modifie aucunement l'effet inducteur de l'hypoxie sur l'activité du promoteur. Par contre, en présence du IkBSR, on assiste à une inhibition de l'augmentation de l'activité du promoteur régie par le TNF α et, de façon surprenante, à des niveaux d'activité luciférase inférieurs aux niveaux de base obtenus chez les cellules non stimulées par le TNF α . Donc, le NF- κ B est essentiel à la régulation de l'activité du promoteur de la TACE par le TNF α , mais est dispensable en condition hypoxique. Ces résultats suggèrent également qu'une voie de signalisation, indépendante du NF- κ B, confère un rôle suppresseur au TNF α dans la régulation du gène de la TACE.

La voie de signalisation de la MAPK Erk est une autre voie importante dans la régulation des gènes en hypoxie. En effet, il est connu que la kinase Erk, induite en hypoxie, phosphoryle la sous-unité HIF-1 α et induit l'activité transcriptionnelle du complexe HIF-1 (Minet et al., 2000; Richard et al., 1999). Cette phosphorylation est spécifique à la kinase Erk puisque les kinases p38 et JNK n'induisent aucun changement post-traductionnel du HIF-1 α . Nous avons donc utilisé des inhibiteurs de MAPK afin d'évaluer l'implication de la kinase Erk dans la régulation hypoxique du promoteur de la TACE chez des synoviocytes. L'ajout de U0126, un inhibiteur de la voie des Erk, diminue de façon significative l'activité du promoteur chez ces cellules, et ce, contrairement au SB202190, un inhibiteur de la MAPK p38 (figure 18C). Nous pouvons donc conclure que la MAPK Erk, probablement via son action sur le HIF-1 α , est essentielle dans la régulation hypoxique du promoteur de la TACE.

3.9 Effet des glucocorticoïdes sur l'induction hypoxique de l'activité du promoteur de la TACE

Le but global de ce projet de recherche était de vérifier les effets de stimuli inflammatoires sur l'expression de la TACE. Jusqu'à présent, nous avons démontré que le $\text{TNF}\alpha$ et l'hypoxie, deux conditions présentes dans le microenvironnement inflammatoire des articulations arthritiques, induisent l'activité du promoteur ainsi que la quantité d'ARNm et de la protéine TACE chez les synoviocytes. Puisque des stimuli impliqués dans le développement de l'inflammation ont un effet inducteur, nous avons voulu déterminer si des molécules anti-inflammatoires pouvaient avoir l'effet inverse. Nous avons donc vérifié l'effet de doses croissantes de dexaméthasone sur la régulation hypoxique du promoteur de la TACE. Ce produit est un glucocorticoïde souvent utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Les résultats présentés à la figure 19 démontrent que l'ajout de dexaméthasone à des synoviocytes transfectés avec le vecteur pTACE-Luc et stimulés en condition hypoxique, inhibe l'induction de l'activité du promoteur de façon concentration dépendante. On observe aussi que cet anti-inflammatoire induit faiblement l'activité du promoteur de la TACE chez les synoviocytes en normoxie. Cependant, cette induction n'est pas significative.

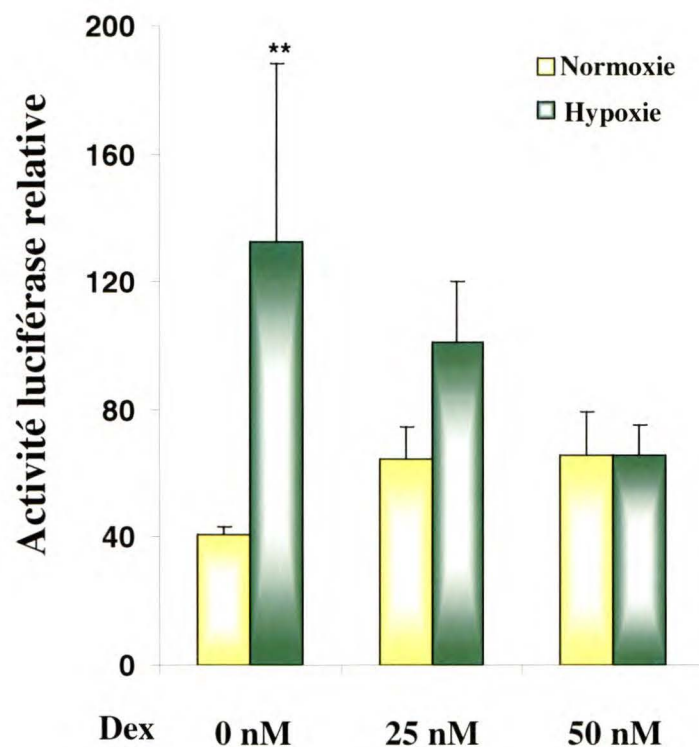


Figure 19 : Effet de la dexaméthasone sur l'induction hypoxique de l'activité du promoteur de la TACE. Les synoviocytes ont été transfectés avec le vecteur pTACE-Luc, privés de sérum et stimulés en hypoxie avec 0, 25 ou 50 nM de dexaméthasone pendant 16 heures. L'activité luciférase résultante a été évaluée tel que décrit dans la section Matériel et méthodes. Les résultats représentent la moyenne de 5 expériences distinctes effectuées en duplicata. ** $p < 0.005$, comparativement aux cellules normoxiques.

4- DISCUSSION

La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie très complexe dont l'étiologie demeure inconnue, et ce, malgré les nombreuses études effectuées depuis les dernières années. Cette affection chronique et dégénérative est caractérisée par l'inflammation et l'hypertrophie de la membrane synoviale (Youssef et al., 1998). Cette dernière envahit l'articulation causant ainsi des dommages articulaires irréversibles tels que la destruction du cartilage et l'érosion des os. La progression de cette maladie autoimmunitaire est influencée par un ensemble de molécules impliquées au niveau de l'activation de la réponse immunitaire, de l'hyperplasie de la membrane synoviale, de l'invasion et de la destruction de l'articulation (Feldmann et al., 1996a). Parmi ces molécules, la cytokine $\text{TNF}\alpha$ est l'une des plus importantes. Cette protéine pro-inflammatoire puissante est responsable de l'induction d'une panoplie de médiateurs impliqués dans la pathogenèse de la PR, dont la production de cytokines inflammatoires, de molécules d'adhésion, de collagénases et de métalloprotéinases de même que l'induction du processus d'angiogenèse (Roberts et McColl, 2004; Subramanian et Handa, 2004). Afin d'exercer ces fonctions, le $\text{TNF}\alpha$ transmembranaire doit être clivé par la TACE pour générer sa forme soluble et active et ainsi agir de façon systémique (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Par conséquent, la TACE, par son activité protéolytique sur le $\text{TNF}\alpha$, est essentielle au développement de la PR. Ceci en fait donc une cible thérapeutique intéressante d'où l'importance de bien comprendre ses mécanismes de régulation.

Toutefois, très peu d'informations sont disponibles concernant la régulation de l'expression de la TACE. Depuis sa découverte en 1997 par le groupe de Black et par celui de Moss, plusieurs chercheurs ont tenté d'identifier des facteurs capables de moduler l'expression de

la TACE. Dans cette quête, il a été démontré que l'IFN γ , l'IL-1 β et le TNF α , de même qu'une combinaison de ces trois cytokines, ne changeaient aucunement la quantité d'ARNm de la TACE exprimée chez des cellules épithéliales de colon humain (Kirkegaard et al., 2004). D'autres stimuli, tels que l'IL-1 α et le LPS, ont été testés chez des cellules HUVEC et aucune modification de l'expression de l'ARNm n'a été observée (Imaizumi et al., 2000). Bien que ces résultats suggèrent que la TACE n'est pas régulée par des mécanismes transcriptionnels, des études récentes présentent de nouvelles évidences suggérant une régulation de l'expression de la TACE au niveau transcriptionnel. Il a été démontré par plusieurs groupes de chercheurs que la quantité d'ARNm de la TACE est augmentée chez différents tissus atteints de pathologies à composantes inflammatoires. Par exemple, les cartilages articulaires de patients atteints de PR présentent un niveau d'expression de l'ARNm de la TACE beaucoup plus élevé que les cartilages de personnes saines (Patel et al., 1998). On note un phénomène similaire chez les tissus tumoraux, provenant de cancers du sein ou du foie, comparativement aux tissus sains (Ding et al., 2004; Lendeckel et al., 2005). De plus, il a été démontré que la stimulation des cellules HL-60 par le LPS induit l'expression de l'ARNm de la TACE, contrairement aux cellules HUVEC et aux cellules épithéliales de colon mentionnées précédemment (Ding et al., 2001). Le groupe de Bzowska, quant à lui, a démontré que l'expression de l'ARNm de la TACE est augmentée chez des cellules endothéliales humaines stimulées par le TNF α tandis que cette induction est absente chez la lignée macrophagique P388/D1 (Bzowska et al., 2004). L'ensemble de ces évidences suggère que les mécanismes de régulation de la TACE diffèrent selon le type cellulaire étudié. Nous avons donc voulu savoir si le TNF α et l'hypoxie, deux conditions présentes au niveau des articulations arthritiques et importantes pour le développement de la PR, pouvaient réguler l'expression de l'ARNm de la TACE chez deux types de cellules, soit

les macrophages (RAW264.7) et les synoviocytes de type B. Ces deux modèles cellulaires représentent les cellules composant la membrane synoviale de l'articulation. Nos résultats, présentés à la figure 8, démontrent que ces deux stimuli induisent l'accumulation de l'ARNm de la TACE chez les deux types cellulaires et, de façon similaire aux résultats obtenus par le groupe de Bzowska, ces inductions sont dépendantes de la synthèse de l'ARN. Nos résultats confirment donc que le TNF α peut induire l'expression de l'ARNm de la TACE, via des mécanismes transcriptionnels, chez les macrophages et les synoviocytes de type B et démontrent pour la première fois que la TACE peut aussi être régulée à la hausse par une baisse d'oxygène.

De façon similaire à l'expression de l'ARNm, il a été démontré que la protéine TACE est augmentée chez des patients atteints de maladies associées à l'inflammation. Par exemple, on note une induction de la TACE au niveau des tissus tumoraux de cancers du sein, comparativement aux tissus sains (Borrell-Pages et al., 2003; Fabre-Lafay et al., 2005). De plus, la TACE exprimée chez les cellules polymorphonucléaires du sang de personnes atteintes d'un sepsis sévère est plus élevée que chez les cellules du sang de personnes saines (Kermarrec et al., 2005). Cependant, les composantes inflammatoires responsables de ces inductions ne sont pas encore connues. Plusieurs conditions ont été testées pour leur capacité à induire la TACE mais sans succès. En effet, il a été démontré que l'ajout de LPS à des monocytes en culture n'entraîne aucun changement de l'expression de la TACE (Black et al., 1997; Cerretti, 1999; Doedens et Black, 2000). De plus, l'expression de cette enzyme par des cellules MG-63 (cellules ayant un phénotype similaire aux ostéoblastes) stimulées avec du TNF α ou de l'IL-1 β est semblable aux cellules non stimulées (Franchimont et al., 2005). Afin de vérifier si les inductions que nous avons observées au niveau de l'ARNm

résultent en une accumulation de la protéine TACE, nous avons effectué des immunobuvardages de type Western à partir des lysats cellulaires des synoviocytes stimulés en hypoxie avec ou sans TNF α . On observe une augmentation de la protéine TACE chez les cellules stimulées comparativement aux cellules contrôles. Nos résultats démontrent donc, pour la première fois, que des stimuli inflammatoires, soit le TNF α et l'hypoxie, induisent l'expression de la TACE au niveau de la protéine chez des synoviocytes en culture.

La TACE a une expression ubiquiste et est présente chez plusieurs types cellulaires dont les macrophages, les cellules T, les neutrophiles, les cellules endothéliales et les myocytes (Black et al., 1997). Les travaux de l'équipe de Schlöndorff ont établi que la TACE se situe, chez les cellules COS-7 non stimulées, dans un compartiment périnucléaire avec une expression faible mais significative à la surface cellulaire et au réticulum endoplasmique (Schlondorff et al., 2000). Nous avons démontré, à l'aide de microscopie confocale, que les synoviocytes présentent un patron d'expression de la TACE similaire aux cellules COS-7, c'est-à-dire une expression intracellulaire prédominante. De plus, on observe que l'induction de la TACE par le TNF α et l'hypoxie se produit également près du noyau. Cette localisation spécifique de la TACE soulève l'hypothèse que cette protéase pourrait être active à l'intérieur de la cellule. Effectivement, Skovronsky et ses collègues ont démontré que le clivage de la protéine précurseure amyloïde par la TACE s'effectue au niveau du *trans*-Golgi (Skovronsky et al., 2000). De plus, il a été établi par le groupe de Solomon que le clivage du pro-TNF α peut survenir dans le compartiment tardif de l'appareil de Golgi (Solomon et al., 1997). Il serait donc intéressant de déterminer chez les synoviocytes si la TACE intracellulaire, induite par le TNF α et l'hypoxie, est effectivement capable de cliver le pro-TNF α à l'intérieur de la cellule. Afin de tester cette hypothèse, nous pourrions pré-

traiter les synoviocytes avec du brefeldin A. Cette molécule est un inhibiteur du transport protéique vers l'appareil de Golgi occasionnant ainsi la rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique. Donc, l'inhibition de la sécrétion du TNF α par les synoviocytes traités avec le brefeldin A laisserait supposer que le clivage de cette cytokine par la TACE s'effectue de façon intracellulaire, possiblement au niveau de l'appareil de Golgi.

Puisque le TNF α soluble a un rôle capital à jouer dans le développement de la PR, nous avons voulu déterminer si la TACE, produite par les synoviocytes soumis à une faible tension d'oxygène en présence ou en l'absence de TNF α , est capable de cliver le TNF α transmembranaire afin de générer sa forme soluble. Les essais ELISA ont démontré que ces deux stimuli induisent effectivement la relâche du TNF α dans le surnageant des synoviocytes en culture. Il est important de noter que, jusqu'à présent, la communauté scientifique croyait que l'activité de la TACE était constitutive et, par conséquent, qu'elle ne pouvait pas être modulée. Nos résultats constituent donc la première évidence qui démontre que l'activité de la TACE peut être régulée à la hausse par des stimuli inflammatoires. Étant donné que le niveau d'expression de TNF α dans les articulations est un marqueur de la sévérité de la PR, il serait intéressant de déterminer si la TACE, principale enzyme responsable de la production du TNF α soluble, peut elle aussi constituer un marqueur de sévérité de la pathologie. Il serait aussi pertinent de vérifier si le clivage des autres substrats de la TACE impliqués dans la progression de la PR est augmenté lors de la stimulation de divers types cellulaires par le TNF α et l'hypoxie. Par exemple, la sécrétion de la chaîne alpha du récepteur à l'IL-6 par la TACE permet d'activer une plus grande variété de cellules, ce qui exacerberait l'inflammation et la sévérité de la maladie (Romano et al., 1997; Rose-

John et Heinrich, 1994). La fractalkine est un autre substrat de la TACE potentiellement impliqué dans la PR. En effet, lorsqu'elle est clivée par la TACE, elle agit en tant que chimioattractant pour les cellules T et les monocytes, ce qui pourrait accélérer la progression de la PR (Garton et al., 2001; Tsou et al., 2001).

Puisque nous avons démontré que l'expression de l'ARNm de la TACE peut être régulée à la hausse par le TNF α et l'hypoxie via des mécanismes transcriptionnels, nous avons tenté de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents. Nous avons donc étudié le promoteur de 2 304 paires de bases qui contrôle l'expression du gène de la TACE. Tout d'abord, nous avons entrepris de cloner la séquence du promoteur de la TACE dans le vecteur d'expression pGL2, et ce, par PCR à partir de l'ADN génomique des cellules RAW264.7 (provenant de souris Balb/c) ou à partir de cellules provenant de souris Balb/c ou C57Bl/6J. Les séquences obtenues et illustrées aux figures 11 et 12 montrent que plusieurs paires de bases sont différentes entre la séquence de cellules RAW264.7 et celle de cellules de souris C57Bl/6J. Il existe donc du polymorphisme entre ces deux espèces de souris au niveau du promoteur de la TACE puisque ces différences sont aussi présentes chez les cellules de souris Balb/c (résultat non présenté) et ne résultent donc pas de mutations ponctuelles potentielles chez les cellules RAW264.7. Puisque nous avons démontré à la figure 13 que l'activité du promoteur de la TACE, provenant de souris C57Bl/6J, est augmentée par l'hypoxie et le TNF α , il serait intéressant de vérifier si le promoteur de la TACE cloné à partir de l'ADN de cellules de souris Balb/c réagit de la même façon face à ces stimuli. Le polymorphisme observé au niveau de la séquence de ce promoteur pourrait peut-être engendrer une régulation de l'expression de la TACE différente entre ces deux espèces de souris. Il se pourrait que ce polymorphisme soit aussi présent chez l'humain et qu'il ait un impact sur le développement

de la PR. En effet, plusieurs gènes, présentant du polymorphisme, ont été identifiés chez des patients atteints de PR et sont soupçonnés d'être impliqués dans la susceptibilité des individus à cette pathologie (Gonzalez-Gay et al., 2002). Par exemple, certains sites polymorphiques ont été découverts dans la séquence du promoteur du gène encodant le TNF α et ces sites sont associés à des variations au niveau de l'expression de cette cytokine et, par conséquent, à la susceptibilité et la sévérité de la PR (Hajeer et al., 1996; Martinez et al., 2000; Udalova et al., 1993). Il se pourrait donc que le polymorphisme au niveau du promoteur de la TACE, s'il est présent chez l'humain, engendre une régulation différente de la TACE, dépendamment des individus, et influence ainsi la progression de la PR via la production de TNF α soluble par cette enzyme.

Une équipe de chercheurs japonais a également cloné le promoteur de la TACE et a effectué des délétions en 5' afin d'étudier les mécanismes responsables de la régulation de l'activité de ce promoteur (Mizui et al., 1999). Ces analyses ont révélé que la délétion des nucléotides situés aux positions -2 304 pb à -991 pb augmente l'activité du promoteur de la TACE de deux fois comparativement au promoteur entier. De plus, la délétion du fragment compris entre les paires de bases -290 et -100 diminue drastiquement l'activité du promoteur de la TACE. Ces résultats suggèrent que des sites de liaison pour des facteurs de transcription ayant une activité répressive sur le promoteur de la TACE se trouvent dans la région distale du promoteur. Ils suggèrent également que la région comprenant les nucléotides -290 à -100 est essentielle à la transcription basale de la TACE. Dans le but d'identifier les régions du promoteur de la TACE impliquées dans la régulation hypoxique de ce promoteur, nous avons fait des délétions en 5' semblables à celles effectuées par le groupe de Mizui (Mizui et al., 1999). De façon analogue aux résultats obtenus par le groupe de chercheurs japonais,

nos résultats suggèrent la présence de sites de liaison pour des facteurs de transcription répressifs dans la partie distale du promoteur (de -2 304 pb à -991 pb). En Effet, la délétion de ce fragment augmente sensiblement l'activité de base du promoteur de la TACE. De plus, lorsqu'on supprime la région proximale du promoteur, soit de -410 pb à -121 pb, une inhibition drastique de l'activité basale du promoteur de la TACE, semblable à celle obtenue par Mizui et al, est observée. Ce qui est nouveau et très intéressant à propos de nos résultats est l'impact de ces délétions sur la régulation hypoxique du promoteur de la TACE. En effet, la délétion des paires de bases -991 à -410 inhibe significativement l'induction hypoxique du promoteur de la TACE. Donc, nos résultats corrélerent avec ceux déjà parus en littérature concernant la nécessité de la région proximale du promoteur de la TACE pour son activité basale. De plus, ils apportent un élément nouveau dans la caractérisation des mécanismes de régulation du promoteur de la TACE en hypoxie, soit l'implication de la section comprenant les paires de bases -991 à -410 essentielle à l'induction hypoxique de l'activité de ce promoteur.

L'analyse de la séquence du promoteur de la TACE révèle la présence de six sites putatifs de liaison au HIF-1, un des principaux facteurs de transcription induits en hypoxie et responsable de la régulation de plusieurs gènes cibles tel que mentionné précédemment (Wang et al., 1995). De plus, le fragment impliqué dans la régulation hypoxique de l'activité du promoteur de la TACE, situé aux positions -991 à -410, présente deux sites de liaison potentiels pour le HIF-1. Ces évidences suggèrent que l'induction par l'hypoxie de l'activité de ce promoteur est régie par le HIF-1. En effet, les résultats que nous avons obtenus à la figure 16A montrent que l'ajout de HIF-1 exogène induit l'activité du promoteur de la TACE, et ce, tant en normoxie qu'en hypoxie. De plus, nous avons établi à la figure 16B

que les sites de liaison H3 et H4, contenus dans la section du promoteur responsable de la régulation hypoxique, sont essentiels à l'induction de l'activité du promoteur régie par l'hypoxie. En effet, la mutation de l'un des deux sites, de même que la mutation combinée des deux sites, engendre une inhibition de l'activité du promoteur de la TACE en hypoxie. La technique d'immunoprécipitation de chromatine (ChIP) pourrait être utilisée afin de vérifier si le HIF-1 se lie directement aux sites H3 et H4 du promoteur de la TACE. Cette nouvelle technologie permet la démonstration qu'un facteur de transcription spécifique se lie à une séquence précise d'ADN native à l'intérieur de cellules en culture. Elle combine la spécificité de l'immunoprécipitation et la sensibilité du PCR. En effet, le ChIP permet, à l'aide d'un anticorps dirigé contre le facteur de transcription étudié, de précipiter les fragments d'ADN liés à ce facteur de transcription. L'ADN ainsi précipité est ensuite amplifié par PCR à l'aide d'oligonucléotides ciblant la région de l'ADN à l'étude. Donc, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre le HIF-1 et d'oligonucléotides ciblant la région du promoteur de la TACE contenant les sites H3 et H4 permettrait de déterminer si le HIF-1 se lie directement à ces sites de liaison lors d'une stimulation hypoxique du promoteur de la TACE.

Afin de confirmer l'implication du facteur de transcription HIF-1 endogène dans la régulation du gène de la TACE, nous avons utilisé deux modèles cellulaires qui ne produisent pas de HIF-1 fonctionnel, soit les cellules d'hépatome Hépa-1 et les fibroblastes de souris embryonnaires. Nous avons démontré, à l'aide de ces deux systèmes, que l'induction de la TACE par l'hypoxie est entièrement dépendante du HIF-1 puisque l'absence de ce facteur de transcription occasionne une perte de l'induction hypoxique des niveaux d'ARNm et de l'activité du promoteur de la TACE. Toutefois, le HIF-1 n'est que

partiellement requis par le $\text{TNF}\alpha$ afin de réguler l'expression du gène de la TACE. En effet, l'absence du HIF-1 entraîne une diminution partielle de l'induction de l'ARNm et de l'activité du promoteur de la TACE régie par le $\text{TNF}\alpha$. Cette implication partielle du HIF-1 n'avait, jusqu'à présent, encore jamais été démontrée pour d'autres gènes cibles du $\text{TNF}\alpha$. Par contre, il a été établi récemment que l'hypoxie et le $\text{TNF}\alpha$ induisent l'expression de l'ARN messenger et de la protéine ainsi que l'activité du promoteur du PAI-1, un gène cible du $\text{TNF}\alpha$ (Li et al., 2005). De plus, la combinaison de ces deux stimuli produit un effet synergétique. Ces résultats sont donc similaires à ceux que nous avons présentés dans ce mémoire. Malheureusement, aucune voie de signalisation potentielle, concernant la régulation du PAI-1 par le $\text{TNF}\alpha$, n'a été étudiée par le groupe de Li. Il se pourrait donc que le HIF-1 soit impliqué dans cette régulation, tout comme il est impliqué dans la régulation de la TACE par le $\text{TNF}\alpha$, puisqu'il a déjà été prouvé que le $\text{TNF}\alpha$ induit la translocation du HIF-1 α vers le noyau de même que la liaison à l'ADN et l'activité transcriptionnelle du HIF-1 (Haddad et Land, 2001; Hellwig-Burgel et al., 1999).

D'autre part, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie du NF- κ B, le IkBSR, nous a permis d'établir que le NF- κ B, un facteur de transcription également connu pour être induit en hypoxie (Koong et al., 1994), n'est pas nécessaire à la régulation hypoxique du promoteur de la TACE. Il serait plutôt essentiel à la régulation de l'activité de ce promoteur par le $\text{TNF}\alpha$. De façon surprenante, on observe qu'en l'absence de NF- κ B, le $\text{TNF}\alpha$ inhibe l'activité du promoteur de la TACE à un niveau inférieur à l'activité basale mesurée chez les cellules non stimulées. Ceci suggère un rôle suppresseur du $\text{TNF}\alpha$ qui est indépendant du NF- κ B en ce qui concerne la régulation du gène de la TACE. Nous pouvons donc supposer que

l'inhibition du NF- κ B permet l'activation d'une voie de signalisation menant à la suppression de l'activité du promoteur de la TACE par le TNF α . Selon cette hypothèse, le NF- κ B contrebalancerait, de façon directe ou indirecte, cet effet suppresseur du TNF α afin d'induire une activité transcriptionnelle positive de ce promoteur. Des résultats préliminaires d'essais luciférase effectués sur les synoviocytes co-transfectés avec le IkBSR ainsi que les délétants en 5' du vecteur pTACE-Luc (résultats non présentés dans ce mémoire) démontrent que l'effet suppresseur du TNF α en présence du IkBSR est maintenu même lorsque la délétion atteint la position -410 du promoteur de la TACE. Ces résultats suggèrent donc que le site de liaison pour le facteur de transcription induit par le TNF α et responsable de la suppression de l'activité du promoteur de la TACE se situe dans la région proximale de ce promoteur. Des essais luciférase utilisant des délétants de la région -410 à -121 du promoteur de la TACE permettraient de mieux définir la région responsable de l'effet suppresseur du TNF α en l'absence du NF- κ B.

Le TNF α est reconnu en tant qu'activateur de la transcription de gènes cibles via l'induction du NF- κ B et très peu d'informations sont disponibles concernant un rôle suppresseur du TNF α . Toutefois, certains chercheurs commencent à s'intéresser à cet autre aspect de cette cytokine. Ainsi, il a été démontré que le TNF α peut inhiber la production de la cytokine IL-12 chez les macrophages humains via l'inhibition de la transcription du gène p40, soit le gène encodant la chaîne formant l'hétérodimère de l'IL-12 en combinaison avec la chaîne p35 (Ma et al., 2000). De plus, la production d'IL-12 chez les macrophages dérivés de souris déficientes en TNF α est significativement plus élevée que celle observée chez les cellules de type sauvage (Hodge-Dufour et al., 1998). Malheureusement, le mécanisme

responsable de cette inhibition et, par la même occasion, de la répression de l'activité du promoteur de la TACE par le TNF α en l'absence du NF- κ B demeure à élucider. L'induction par le TNF α d'un facteur de transcription de la famille de protéines Ets-1 pourrait être une voie de signalisation potentielle pour son rôle suppresseur sur l'activité du promoteur de la TACE. En effet, le groupe de Dietmar von der Ahe a établi que le TNF α inhibe l'activité du promoteur de la thrombomoduline chez les cellules endothéliales humaines via l'induction d'un membre, encore non identifié, de la famille de protéines Ets-1 (von der Ahe et al., 1993). L'analyse de la séquence du promoteur de la TACE indique la présence de sites putatifs de liaison pour les facteurs de transcription de la famille Ets-1 (EBS : *Ets-binding site*) (Gunther et al., 1990). On note 13 sites composés de la séquence 5'-GGAA-3' (situés aux positions 72, 418, 838, 867, 1 423, 1 595, 1 954, 1 985, 1 989, 2 115, 2 222 et 2 299 pb du promoteur de la TACE) et 4 sites composés de la séquence 5'-GGAT-3' (situés aux positions 250, 502, 1 096, 1 719 pb). Il se pourrait donc que, chez les synoviocytes, le TNF α induise un membre de cette famille afin d'inhiber l'activité de ce promoteur.

Nous avons établi précédemment que le HIF-1 est essentiel à la régulation hypoxique du promoteur de la TACE. Il a été démontré que la MAPK Erk, induite en hypoxie, phosphoryle la sous-unité HIF-1 α et induit l'activité transcriptionnelle du complexe HIF-1 (Minet et al., 2000; Richard et al., 1999). Cette phosphorylation est spécifique à la kinase Erk puisque les kinases p38 et JNK n'induisent aucun changement post-traductionnel du HIF-1 α . Nous avons donc voulu déterminer l'implication des kinases Erk et p38 dans la régulation hypoxique de l'activité du promoteur de la TACE. L'utilisation d'inhibiteur de MAPK a démontré que la kinase Erk est essentielle à l'induction du promoteur par l'hypoxie

tandis que la kinase p38 est dispensable en condition hypoxique. Donc, l'hypoxie, via l'induction de la kinase Erk et possiblement la phosphorylation du HIF-1 α , régule à la hausse l'activité du promoteur de la TACE.

Puisque nous avons démontré précédemment que des stimuli inflammatoires, soit l'hypoxie et le TNF α , régulent à la hausse l'expression du gène encodant la TACE, nous avons voulu savoir si des agents anti-inflammatoires pouvaient avoir l'effet opposé sur l'activité du promoteur de la TACE. Les résultats de la figure 19 démontrent que l'ajout de dexaméthasone, un glucocorticoïde souvent utilisé dans le traitement de la PR (Clark, 2003), inhibe complètement l'induction hypoxique de l'activité du promoteur de la TACE de façon concentration dépendante. Une des voies de signalisation empruntées par les glucocorticoïdes est via leur liaison à un récepteur cytosolique (*glucocorticoid receptor, GR*) (Schoneveld et al., 2004). Une fois le complexe glucocorticoïde:GR formé, il transloque au noyau afin de moduler l'expression de gènes cibles via la liaison du complexe à des sites GRE (*glucocorticoid- responsive elements*) situés au niveau du promoteur de ces gènes. Il existe 4 types de GRE : GRE simple, demi-GRE, GRE négatif et GRE indirect. Le GRE simple se lie à un GR homodimère tandis que le demi-GRE se lie à un GR monomère afin d'activer la transcription de gènes cibles tels que le récepteur β 2-adrénérrique ou la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (Cornett et al., 1998; Lamas et al., 1997; Segard-Maurel et al., 1996; Tsai et al., 1988). L'homodimère GR peut aussi avoir un rôle répresseur via la liaison aux sites GRE négatifs et inhiber, par exemple, la transcription du gène encodant la pro-opiomélanocortine ou le récepteur à la sérotonine neuronale 5-HT1A (Drouin et al., 1993; Ou et al., 2001). Finalement, le GRE indirect, tel que son nom l'implique, se lie à un GR homodimère indirectement via le recrutement d'autres facteurs de transcription afin d'activer

ou d'inhiber la transcription de gènes cibles tels que la β -caséine (Cella et al., 1998). Puisque des sites GRE négatifs sont présents au niveau de la séquence du promoteur de la TACE, il se pourrait que la dexaméthasone emprunte cette voie afin de réguler à la baisse l'expression du gène de la TACE.

Une autre voie de signalisation, cette fois indirecte, est également envisageable. Il est connu que la dexaméthasone possède la capacité d'induire l'accumulation de la phosphatase MKP-1 via l'induction de l'activité du promoteur de cette enzyme et l'inhibition de sa dégradation par les protéasomes (Kassel et al., 2001). Il a également été démontré que l'inhibition de la MKP-1, par de petits ARN d'interférence, entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle du HIF-1 (Liu et al., 2003). L'effet inhibiteur de la MKP-1 sur l'activité du HIF-1 pourrait passer via l'inhibition de la voie de signalisation de la MAPK Erk puisqu'il est connu que la MKP-1 a la capacité de déphosphoryler et d'inactiver cette kinase et que cette dernière, tel que mentionné précédemment, est essentielle à l'activité transcriptionnelle du HIF-1 (Engelbrecht et al., 2003; Pervin et al., 2003; Richard et al., 1999). Il se pourrait donc que la dexaméthasone, via l'induction de la MKP-1 et l'inhibition de la MAPK Erk, inhibe l'activité du HIF-1 et, par conséquent, diminue l'activité du promoteur de la TACE induite par l'hypoxie. Afin de vérifier cette hypothèse, nous pourrions, à l'aide d'immunobuvardage de type Western, évaluer la production de MKP-1 et l'état de phosphorylation du HIF-1 α chez les synoviocytes traités en hypoxie avec ou sans dexaméthasone. La figure 19 démontre aussi que la dexaméthasone, lorsqu'elle est ajoutée à des synoviocytes en normoxie, induit faiblement l'activité de promoteur de la TACE. Cependant, cette induction n'est pas significative. Il serait donc intéressant de vérifier si cet effet opposé de la dexaméthasone chez les synoviocytes normoxiques, comparativement aux

cellules hypoxiques, est aussi présent au niveau de l'expression de l'ARN messager et de la protéine de la TACE. Si tel est le cas, ce phénomène pourrait s'expliquer par l'utilisation de voies de signalisation différentes. En effet, il est possible que la dexaméthasone, lorsqu'elle est utilisée en conditions plus physiologique (normoxie), induise des facteurs de transcription différents de ceux induits in condition inflammatoire (hypoxie) produisant ainsi un effet opposé.

L'ensemble de ces résultats démontre que l'hypoxie et le $\text{TNF}\alpha$, deux conditions présentes au niveau des articulations arthritiques, régulent à la hausse l'expression du gène de la TACE chez des synoviocytes de rats. Il serait pertinent de déterminer si ces inductions sont aussi présentes chez l'humain. Pour ce faire, nous pourrions, à partir de coupes de tissus articulaires de patients arthritiques, tenter de co-localiser le HIF-1, le $\text{TNF}\alpha$ ainsi que la TACE. Ces résultats aideraient à mieux comprendre la pathophysiologie de la PR et ainsi permettre le développement de nouvelles avenues pour des stratégies thérapeutiques. Par exemple, puisque les articulations arthritiques présentent un niveau d'oxygène très faible, un gène encodant un inhibiteur de la TACE sous le contrôle d'un promoteur régulé par le HIF-1 pourrait être inséré dans les articulations atteintes de PR afin d'inhiber l'expression de la TACE et, par la même occasion, la production de $\text{TNF}\alpha$ soluble limitant ainsi l'inflammation et les dommages articulaires. Cette thérapie génique pourrait aussi être utilisée chez des cellules mobiles, telles que les macrophages étant donné que ces cellules sont recrutées aux articulations lors du développement de la PR. Puisque la TACE a une expression ubiquiste, il serait intéressant d'étudier ses mécanismes de régulation par l'hypoxie et le $\text{TNF}\alpha$ dans d'autres pathologies à composantes inflammatoires telles que la maladie de Crohn ou la sclérose en plaques.

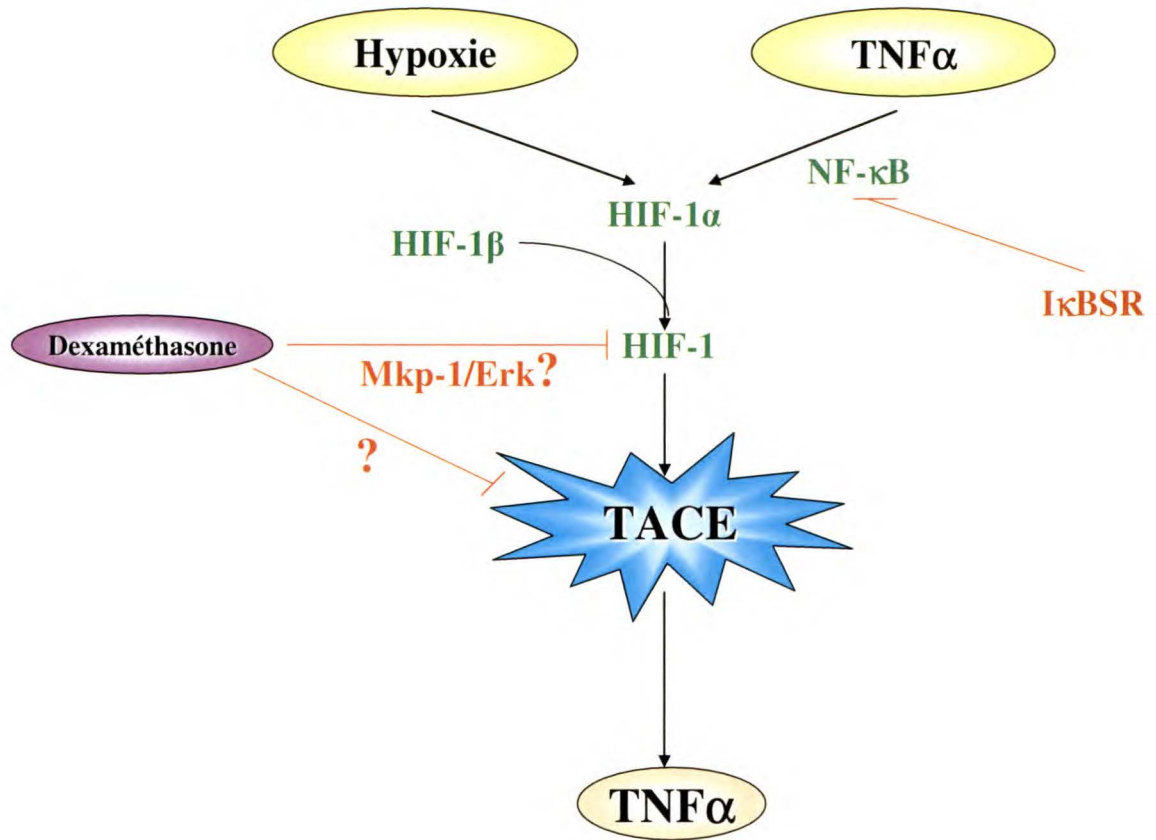


Figure 20 : Schéma récapitulatif des résultats. L'hypoxie et le $\text{TNF}\alpha$, présents au niveau des articulations arthritiques, stabilisent la sous-unité $\text{HIF-1}\alpha$, via la voie de signalisation du $\text{NF-}\kappa\text{B}$ en ce qui concerne le $\text{TNF}\alpha$, qui transloque au noyau et dimérise avec la sous-unité $\text{HIF-1}\beta$. Le complexe HIF-1 ainsi formé se lie aux éléments HRE contenus dans le promoteur de la TACE et régule à la hausse l'expression de cette protéase. Cette dernière clive ensuite le $\text{TNF}\alpha$ transmembranaire afin de générer le $\text{TNF}\alpha$ soluble. D'autre part, la dexaméthasone, un anti-inflammatoire puissant, inhibe l'activité du promoteur de la TACE possiblement via une interaction directe avec le promoteur de la TACE ou en inhibant l'activité transcriptionnelle du HIF-1 via l'induction de la MKP-1 et la déphosphorylation de la kinase Erk.

5- CONCLUSION

L'objectif global de ce projet de recherche consistait à étudier les mécanismes de régulation de l'enzyme TACE, en condition inflammatoire tel que chez les articulations arthritiques. Pour ce faire, nous avons choisi deux médiateurs importants dans le développement de la polyarthrite rhumatoïde, soit le TNF α et l'hypoxie. Nous avons établi par RT-PCR et qRT-PCR que ces deux stimuli, séparément ou en combinaison, induisent via un mécanisme transcriptionnel l'accumulation de l'ARNm de la TACE chez les synoviocytes et les macrophages. De plus, nous avons démontré que l'augmentation d'ARNm dans ces conditions corrèle avec l'accumulation de la TACE au niveau de la protéine. La TACE ainsi produite est fonctionnellement active puisqu'on assiste à un clivage accru du TNF α transmembranaire chez les synoviocytes stimulés par le TNF α et l'hypoxie.

Nous avons ensuite déterminé, à l'aide d'essais luciférase, que les mécanismes transcriptionnels régissant la régulation hypoxique de la TACE nécessitent la présence du facteur de transcription HIF-1 ainsi que deux sites de liaison HRE contenus dans le promoteur de la TACE. L'induction de la TACE par le TNF α , quant à elle, requiert principalement, en plus du HIF-1, la présence du facteur de transcription NF- κ B. De façon surprenante, lorsque ce facteur est absent, le TNF α a plutôt un effet répresseur sur l'activité du promoteur de la TACE. Finalement, nous avons démontré que, contrairement aux stimuli inflammatoires (l'hypoxie et le TNF α), la dexaméthasone, un anti-inflammatoire fréquemment utilisé dans le traitement de la PR, a un effet inhibiteur sur l'activité du promoteur de la TACE.

L'ensemble de ce projet de recherche nous aide à mieux comprendre le processus multifactoriel du développement de la PR. En effet, ces résultats indiquent que la présence de TNF α et de zones hypoxiques au niveau des articulations arthritiques induisent, via les facteurs de transcription HIF-1 et NF- κ B, l'accumulation et l'activité de la TACE. Ce phénomène engendre une disponibilité accrue du TNF α soluble, une cytokine pro-inflammatoire puissante impliquée dans l'amplification de la réponse inflammatoire. Ces résultats suggèrent donc le choix de la TACE en tant que cible dans le traitement de la PR afin de limiter l'inflammation et les dommages articulaires.

6- REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier sincèrement ma directrice, D^{re} Claire M. Dubois, pour toute l'aide apportée durant mes études supérieures. Sa rigueur scientifique, son sens critique ainsi que ses nombreuses connaissances ont grandement contribué à ma formation scientifique. Grâce à sa confiance en moi, j'ai pu agir selon mes ambitions pour réaliser ce projet de recherche que je trouve très intéressant. Je tiens à la remercier pour le temps et la patience qu'elle m'a accordés tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais également remercier les membres du jury, soit les D^{rs} Claire M. Dubois, Subburaj Ilangumaran et Benoît Paquette, pour avoir donné de leur temps à la correction de ce mémoire.

Je désire remercier aussi les membres du laboratoire du D^{re} Dubois, spécialement Stéphanie McMahon, d'avoir toujours pris le temps nécessaire pour répondre à mes nombreuses questions et d'avoir participé généreusement à mon intégration au laboratoire. Je remercie Francine Grondin pour son appui technique et ses encouragements de même que les étudiants du laboratoire : Philippe Guimont, Sébastien Grandmont et Julie Leblond. Grâce à leur compagnie et aux situations loufoques vécues ensemble, mon passage au laboratoire fut très agréable.

Je remercie les professeurs, les étudiants, les secrétaires et le personnel technique du programme d'immunologie qui ont facilité mes études et avec qui ce fut un plaisir de travailler. Je dis un merci sincère à Léonid Volkov pour sa patience et ses explications

détaillées lors des prises d'images en microscopie confocale et pour le traitement de ces photos.

J'adresse des remerciements spéciaux aux membres de ma famille : à mon père Jean qui m'a appris le plaisir et l'importance du travail bien fait, à ma mère Thérèse pour son appui inconditionnel et à ma sœur Marie-Josée pour ses nombreux encouragements lors de la rédaction de ce mémoire. Enfin, je désire remercier de tout mon cœur mon conjoint Mathieu pour sa patience infinie. Sa présence dans ma vie et son sens de l'humour ont égayé toutes ces années d'études et surtout dans les moments difficiles.

7- RÉFÉRENCES

- Abram, C.L., Seals, D.F., Pass, I., Salinsky, D., Maurer, L., Roth, T.M. et Courtneidge, S.A. (2003) The adaptor protein fish associates with members of the ADAMs family and localizes to podosomes of Src-transformed cells. *J Biol Chem*, **278**, 16844-16851.
- Aderka, D. (1996) The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, **7**, 231-240.
- Aho, K., Koskenvuo, M., Tuominen, J. et Kaprio, J. (1986) Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol*, **13**, 899-902.
- Almeida, E.A., Huovila, A.P., Sutherland, A.E., Stephens, L.E., Calarco, P.G., Shaw, L.M., Mercurio, A.M., Sonnenberg, A., Primakoff, P., Myles, D.G. et White, J.M. (1995) Mouse egg integrin alpha 6 beta 1 functions as a sperm receptor. *Cell*, **81**, 1095-1104.
- Althoff, K., Reddy, P., Voltz, N., Rose-John, S. et Mullberg, J. (2000) Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem*, **267**, 2624-2631.
- Amour, A., Slocombe, P.M., Webster, A., Butler, M., Knight, C.G., Smith, B.J., Stephens, P.E., Shelley, C., Hutton, M., Knauper, V., Docherty, A.J. et Murphy, G. (1998) TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett*, **435**, 39-44.
- Anders, A., Gilbert, S., Garten, W., Postina, R. et Fahrenholz, F. (2001) Regulation of the alpha-secretase ADAM10 by its prodomain and proprotein convertases. *Faseb J*, **15**, 1837-1839.
- Arany, Z., Huang, L.E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M.A., Bunn, H.F. et Livingston, D.M. (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12969-12973.
- Arend, W.P. et Dayer, J.M. (1995) Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **38**, 151-160.
- Arribas, J., Lopez-Casillas, F. et Massague, J. (1997) Role of the juxtamembrane domains of the transforming growth factor-alpha precursor and the beta-amyloid precursor protein in regulated ectodomain shedding. *J Biol Chem*, **272**, 17160-17165.
- Asakura, M., Kitakaze, M., Takashima, S., Liao, Y., Ishikura, F., Yoshinaka, T., Ohmoto, H., Node, K., Yoshino, K., Ishiguro, H., Asanuma, H., Sanada, S., Matsumura, Y.,

- Takeda, H., Beppu, S., Tada, M., Hori, M. et Higashiyama, S. (2002) Cardiac hypertrophy is inhibited by antagonism of ADAM12 processing of HB-EGF: metalloproteinase inhibitors as a new therapy. *Nat Med*, **8**, 35-40.
- Athanasou, N.A. (1995) Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis*, **54**, 392-394.
- Barland, P., Novikoff, A.B. et Hamerman, D. (1962) Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol*, **14**, 207-220.
- Baud, V. et Karin, M. (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, **11**, 372-377.
- Baud, V., Liu, Z.G., Bennett, B., Suzuki, N., Xia, Y. et Karin, M. (1999) Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev*, **13**, 1297-1308.
- Bauvois, B. (2004) Transmembrane proteases in cell growth and invasion: new contributors to angiogenesis? *Oncogene*, **23**, 317-329.
- Beckner, M.E. (1999) Factors promoting tumor angiogenesis. *Cancer Invest*, **17**, 594-623.
- Bettinger, B.T., Gilbert, D.M. et Amberg, D.C. (2004) Actin up in the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **5**, 410-415.
- Beutler, B. et Cerami, A. (1988) The history, properties, and biological effects of cachectin. *Biochemistry*, **27**, 7575-7582.
- Beutler, B. et Cerami, A. (1989) The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, **7**, 625-655.
- Bigler, D., Takahashi, Y., Chen, M.S., Almeida, E.A., Osbourne, L. et White, J.M. (2000) Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 2 (fertilin beta) and murine eggs. Role of the alpha(6) integrin subunit. *J Biol Chem*, **275**, 11576-11584.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J. et Cerretti, D.P. (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, **385**, 729-733.
- Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., Myles, D.G., Primakoff, P. et White, J.M. (1992) A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, **356**, 248-252.

- Borrell-Pages, M., Rojo, F., Albanell, J., Baselga, J. et Arribas, J. (2003) TACE is required for the activation of the EGFR by TGF- α in tumors. *Embo J*, **22**, 1114-1124.
- Brennan, F.M., Chantry, D., Jackson, A., Maini, R. et Feldmann, M. (1989) Inhibitory effect of TNF α antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*, **2**, 244-247.
- Brennan, F.M., Gibbons, D.L., Cope, A.P., Katsikis, P., Maini, R.N. et Feldmann, M. (1995) TNF inhibitors are produced spontaneously by rheumatoid and osteoarthritic synovial joint cell cultures: evidence of feedback control of TNF action. *Scand J Immunol*, **42**, 158-165.
- Bridges, L.C. et Bowditch, R.D. (2005) ADAM-Integrin Interactions: potential integrin regulated ectodomain shedding activity. *Curr Pharm Des*, **11**, 837-847.
- Bridges, L.C., Tani, P.H., Hanson, K.R., Roberts, C.M., Judkins, M.B. et Bowditch, R.D. (2002) The lymphocyte metalloprotease MDC-L (ADAM 28) is a ligand for the integrin $\alpha 4 \beta 1$. *J Biol Chem*, **277**, 3784-3792.
- Brou, C., Logeat, F., Gupta, N., Bessia, C., LeBail, O., Doedens, J.R., Cumano, A., Roux, P., Black, R.A. et Israel, A. (2000) A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE. *Mol Cell*, **5**, 207-216.
- Bruick, R.K. (2000) Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 9082-9087.
- Bruick, R.K. et McKnight, S.L. (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science*, **294**, 1337-1340.
- Buxbaum, J.D., Liu, K.N., Luo, Y., Slack, J.L., Stocking, K.L., Peschon, J.J., Johnson, R.S., Castner, B.J., Cerretti, D.P. et Black, R.A. (1998) Evidence that tumor necrosis factor α converting enzyme is involved in regulated α -secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem*, **273**, 27765-27767.
- Bzowska, M., Jura, N., Lassak, A., Black, R.A. et Bereta, J. (2004) Tumour necrosis factor- α stimulates expression of TNF- α converting enzyme in endothelial cells. *Eur J Biochem*, **271**, 2808-2820.
- Cal, S., Freije, J.M., Lopez, J.M., Takada, Y. et Lopez-Otin, C. (2000) ADAM 23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the $\alpha 5 \beta 3$ integrin through an RGD-independent mechanism. *Mol Biol Cell*, **11**, 1457-1469.
- Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N. et Williamson, B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 3666-3670.

- Cella, N., Groner, B. et Hynes, N.E. (1998) Characterization of Stat5a and Stat5b homodimers and heterodimers and their association with the glucocorticoid receptor in mammary cells. *Mol Cell Biol*, **18**, 1783-1792.
- Cerretti, D.P. (1999) Characterization of the tumour necrosis factor alpha-converting enzyme, TACE/ADAM17. *Biochem Soc Trans*, **27**, 219-223.
- Cerretti, D.P., DuBose, R.F., Black, R.A. et Nelson, N. (1999) Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*, **263**, 810-815.
- Chantry, A. et Glynn, P. (1990) A novel metalloproteinase originally isolated from brain myelin membranes is present in many tissues. *Biochem J*, **268**, 245-248.
- Chatham, W.W., Swaim, R., Frohsin, H., Jr., Heck, L.W., Miller, E.J. et Blackburn, W.D., Jr. (1993) Degradation of human articular cartilage by neutrophils in synovial fluid. *Arthritis Rheum*, **36**, 51-58.
- Choi, I., Woo, J.M., Hong, S., Jung, Y.K., Kim do, H. et Cho, C. (2003) Identification and characterization of ADAM32 with testis-predominant gene expression. *Gene*, **304**, 151-162.
- Clark, A.R. (2003) MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids? *J Endocrinol*, **178**, 5-12.
- Coimbra, I.B., Jimenez, S.A., Hawkins, D.F., Piera-Velazquez, S. et Stokes, D.G. (2004) Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, **12**, 336-345.
- Conway, J.G., Andrews, R.C., Beaudet, B., Bickett, D.M., Boncek, V., Brodie, T.A., Clark, R.L., Crumrine, R.C., Leenitzer, M.A., McDougald, D.L., Han, B., Hedeon, K., Lin, P., Milla, M., Moss, M., Pink, H., Rabinowitz, M.H., Tippin, T., Scates, P.W., Selph, J., Stimpson, S.A., Warner, J. et Becherer, J.D. (2001) Inhibition of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) production and arthritis in the rat by GW3333, a dual inhibitor of TNF-alpha-converting enzyme and matrix metalloproteinases. *J Pharmacol Exp Ther*, **298**, 900-908.
- Cornett, L.E., Hiller, F.C., Jacobi, S.E., Cao, W. et McGraw, D.W. (1998) Identification of a glucocorticoid response element in the rat beta2-adrenergic receptor gene. *Mol Pharmacol*, **54**, 1016-1023.
- Cotter, R., Williams, C., Ryan, L., Erichsen, D., Lopez, A., Peng, H. et Zheng, J. (2002) Fractalkine (CX3CL1) and brain inflammation: Implications for HIV-1-associated dementia. *J Neurovirol*, **8**, 585-598.
- Cousin, H., Gaultier, A., Bleux, C., Darribere, T. et Alfandari, D. (2000) PACSIN2 is a regulator of the metalloprotease/disintegrin ADAM13. *Dev Biol*, **227**, 197-210.

- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., Firestein, G.S., Gerber, H.P., Ferrara, N. et Johnson, R.S. (2003) HIF-1 α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, **112**, 645-657.
- Crowther, M., Brown, N.J., Bishop, E.T. et Lewis, C.E. (2001) Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors. *J Leukoc Biol*, **70**, 478-490.
- Cybulsky, M.I. et Hegele, R.A. (2003) The fractalkine receptor CX3CR1 is a key mediator of atherogenesis. *J Clin Invest*, **111**, 1118-1120.
- Day, R. (2002) Adverse reactions to TNF- α inhibitors in rheumatoid arthritis. *Lancet*, **359**, 540-541.
- Dery, M.A., Michaud, M.D. et Richard, D.E. (2005) Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 535-540.
- Dessen, A., Lawrence, C.M., Cupo, S., Zaller, D.M. et Wiley, D.C. (1997) X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II. *Immunity*, **7**, 473-481.
- Devin, A., Cook, A., Lin, Y., Rodriguez, Y., Kelliher, M. et Liu, Z. (2000) The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. *Immunity*, **12**, 419-429.
- Di Giovine, F.S., Nuki, G. et Duff, G.W. (1988) Tumour necrosis factor in synovial exudates. *Ann Rheum Dis*, **47**, 768-772.
- Diaz-Rodriguez, E., Cabrera, N., Esparis-Ogando, A., Montero, J.C. et Pandiella, A. (1999) Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci*, **11**, 1421-1430.
- Diaz-Rodriguez, E., Montero, J.C., Esparis-Ogando, A., Yuste, L. et Pandiella, A. (2002) Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor α -converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. *Mol Biol Cell*, **13**, 2031-2044.
- Ding, T., Li, L., Zhu, K., Huang, W. et Yang, Y. (2001) Relationship between the increase of secretion of sTNF α induced by lipopolysaccharides and the enhanced expression of TACE mRNA in HL-60 cells and adhesive cells from human spleen. *J Tongji Med Univ*, **21**, 265-268, 279.
- Ding, X., Yang, L.Y., Huang, G.W., Wang, W. et Lu, W.Q. (2004) ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, **10**, 2735-2739.

- Dingle, J.T. et Thomas, D.P. (1956) In vitro studies on human synovial membrane; a metabolic comparison of normal and rheumatoid tissue. *Br J Exp Pathol*, **37**, 318-323.
- Distler, J.H., Wenger, R.H., Gassmann, M., Kurowska, M., Hirth, A., Gay, S. et Distler, O. (2004) Physiologic responses to hypoxia and implications for hypoxia-inducible factors in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **50**, 10-23.
- Doedens, J.R. et Black, R.A. (2000) Stimulation-induced down-regulation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*, **275**, 14598-14607.
- Drouin, J., Sun, Y.L., Chamberland, M., Gauthier, Y., De Lean, A., Nemer, M. et Schmidt, T.J. (1993) Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *Embo J*, **12**, 145-156.
- Ebert, B.L., Firth, J.D. et Ratcliffe, P.J. (1995) Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct Cis-acting sequences. *J Biol Chem*, **270**, 29083-29089.
- Eckhart, A.D., Yang, N., Xin, X. et Faber, J.E. (1997) Characterization of the alpha1B-adrenergic receptor gene promoter region and hypoxia regulatory elements in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 9487-9492.
- Edwards, J.C. et Willoughby, D.A. (1982) Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers. *Ann Rheum Dis*, **41**, 177-182.
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L. et Fujii-Kuriyama, Y. (1999) Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *Embo J*, **18**, 1905-1914.
- Endres, K., Anders, A., Kojro, E., Gilbert, S., Fahrenholz, F. et Postina, R. (2003) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme is processed by proprotein-convertases to its mature form which is degraded upon phorbol ester stimulation. *Eur J Biochem*, **270**, 2386-2393.
- Engelbrecht, Y., de Wet, H., Horsch, K., Langeveldt, C.R., Hough, F.S. et Hulley, P.A. (2003) Glucocorticoids induce rapid up-regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase and impair proliferation in human and mouse osteoblast cell lines. *Endocrinology*, **144**, 412-422.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., Tian, Y.M., Masson, N., Hamilton, D.L., Jaakkola, P., Barstead, R., Hodgkin, J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Schofield, C.J. et Ratcliffe, P.J. (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs

define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, **107**, 43-54.

- Erez, N., Stambolsky, P., Shats, I., Milyavsky, M., Kachko, T. et Rotter, V. (2004) Hypoxia-dependent regulation of PHD1: cloning and characterization of the human PHD1/EGLN2 gene promoter. *FEBS Lett*, **567**, 311-315.
- Estes, S.D., Stoler, D.L. et Anderson, G.R. (1995) Anoxic induction of a sarcoma virus-related VL30 retrotransposon is mediated by a cis-acting element which binds hypoxia-inducible factor 1 and an anoxia-inducible factor. *J Virol*, **69**, 6335-6341.
- Eto, K., Huet, C., Tarui, T., Kupriyanov, S., Liu, H.Z., Puzon-McLaughlin, W., Zhang, X.P., Sheppard, D., Engvall, E. et Takada, Y. (2002) Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to integrin alpha 9beta 1: implications for sperm-egg binding and other cell interactions. *J Biol Chem*, **277**, 17804-17810.
- Eto, K., Puzon-McLaughlin, W., Sheppard, D., Sehara-Fujisawa, A., Zhang, X.P. et Takada, Y. (2000) RGD-independent binding of integrin alpha9beta1 to the ADAM-12 and -15 disintegrin domains mediates cell-cell interaction. *J Biol Chem*, **275**, 34922-34930.
- Fabre-Lafay, S., Garrido-Urbani, S., Reymond, N., Goncalves, A., Dubreuil, P. et Lopez, M. (2005) Nectin-4, a new serological breast cancer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. *J Biol Chem*, **280**, 19543-19550.
- Fan, H., Turck, C.W. et Derynck, R. (2003) Characterization of growth factor-induced serine phosphorylation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme and of an alternatively translated polypeptide. *J Biol Chem*, **278**, 18617-18627.
- Fassbender, H.G. et Gay, S. (1988) Synovial processes in rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol Suppl*, **76**, 1-7.
- Feldmann, M., Brennan, F.M. et Maini, R.N. (1996a) Rheumatoid arthritis. *Cell*, **85**, 307-310.
- Feldmann, M., Brennan, F.M. et Maini, R.N. (1996b) Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, **14**, 397-440.
- Feldser, D., Agani, F., Iyer, N.V., Pak, B., Ferreira, G. et Semenza, G.L. (1999) Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res*, **59**, 3915-3918.
- Ferri, L.E., Pascual, J., Seely, A.J., Chaudhury, P. et Christou, N.V. (2002) Soluble L-selectin attenuates tumor necrosis factor-alpha-mediated leukocyte adherence and vascular permeability: a protective role for elevated soluble L-selectin in sepsis. *Crit Care Med*, **30**, 1842-1847.

- Firestein, G.S. (1996) Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum*, **39**, 1781-1790.
- Firth, J.D., Ebert, B.L., Pugh, C.W. et Ratcliffe, P.J. (1994) Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6496-6500.
- Firth, J.D., Ebert, B.L. et Ratcliffe, P.J. (1995) Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements. *J Biol Chem*, **270**, 21021-21027.
- FitzGerald, O., Soden, M., Yanni, G., Robinson, R. et Bresnihan, B. (1991) Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, **50**, 792-796.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D. et Semenza, G.L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, **16**, 4604-4613.
- Franchimont, N., Lambert, C., Huynen, P., Ribbens, C., Relic, B., Chariot, A., Bours, V., Piette, J., Merville, M.P. et Malaise, M. (2005) Interleukin-6 receptor shedding is enhanced by interleukin-1 β and tumor necrosis factor α and is partially mediated by tumor necrosis factor α -converting enzyme in osteoblast-like cells. *Arthritis Rheum*, **52**, 84-93.
- Frayne, J., Hurd, E.A. et Hall, L. (2002) Human tMDC III: a sperm protein with a potential role in oocyte recognition. *Mol Hum Reprod*, **8**, 817-822.
- Frayne, J., Jury, J.A., Barker, H.L. et Hall, L. (1997) Rat MDC family of proteins: sequence analysis, tissue distribution, and expression in prepubertal and adult rat testis. *Mol Reprod Dev*, **48**, 159-167.
- Gandy, S. et Petanceska, S. (2000) Neurohormonal signalling pathways and the regulation of Alzheimer beta-amyloid metabolism. *Novartis Found Symp*, **230**, 239-251; discussion 251-233.
- Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., Murphy, G., Greaves, D.R., Dempsey, P.J. et Raines, E.W. (2001) Tumor necrosis factor- α -converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem*, **276**, 37993-38001.
- Gerber, H.P., Condorelli, F., Park, J. et Ferrara, N. (1997) Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem*, **272**, 23659-23667.

- Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Maltezos, E., Athanassou, N., Papazoglou, D., Gatter, K.C., Harris, A.L. et Koukourakis, M.I. (2003) Upregulated hypoxia inducible factor-1alpha and -2alpha pathway in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, **5**, R193-201.
- Gilpin, B.J., Loechel, F., Mattei, M.G., Engvall, E., Albrechtsen, R. et Wewer, U.M. (1998) A novel, secreted form of human ADAM 12 (meltrin alpha) provokes myogenesis in vivo. *J Biol Chem*, **273**, 157-166.
- Goetz, F.W., Planas, J.V. et MacKenzie, S. (2004) Tumor necrosis factors. *Dev Comp Immunol*, **28**, 487-497.
- Goldblatt, F. et Isenberg, D.A. (2005) New therapies for rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol*, **140**, 195-204.
- Gonzalez-Gay, M.A., Garcia-Porrua, C. et Hajeer, A.H. (2002) Influence of human leukocyte antigen-DRB1 on the susceptibility and severity of rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum*, **31**, 355-360.
- Gorman, J.D. et Criswell, L.A. (2002) The shared epitope and severity of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, **28**, 59-78.
- Graven, K.K., Yu, Q., Pan, D., Roncarati, J.S. et Farber, H.W. (1999) Identification of an oxygen responsive enhancer element in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *Biochim Biophys Acta*, **1447**, 208-218.
- Gregersen, P.K., Silver, J. et Winchester, R.J. (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **30**, 1205-1213.
- Grell, M., Douni, E., Wajant, H., Lohden, M., Clauss, M., Maxeiner, B., Georgopoulos, S., Lesslauer, W., Kollias, G., Pfizenmaier, K. et Scheurich, P. (1995) The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **83**, 793-802.
- Grosfeld, A., Zilberfarb, V., Turban, S., Andre, J., Guerre-Millo, M. et Issad, T. (2002) Hypoxia increases leptin expression in human PAZ6 adipose cells. *Diabetologia*, **45**, 527-530.
- Gunther, C.V., Nye, J.A., Bryner, R.S. et Graves, B.J. (1990) Sequence-specific DNA binding of the proto-oncoprotein ets-1 defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Moloney murine sarcoma virus. *Genes Dev*, **4**, 667-679.
- Gupta, S.K., Alves, K., Palladino, L.O., Mark, G.E. et Hollis, G.F. (1996) Molecular cloning of the human fertilin beta subunit. *Biochem Biophys Res Commun*, **224**, 318-326.

- Haddad, J.J. et Land, S.C. (2001) A non-hypoxic, ROS-sensitive pathway mediates TNF- α -dependent regulation of HIF-1 α . *FEBS Lett*, **505**, 269-274.
- Hajeer, A.H., Worthington, J., Silman, A.J. et Ollier, W.E. (1996) Association of tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms with HLA-DRB1*04-bearing haplotypes in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*, **39**, 1109-1114.
- Harada, T., Nishie, A., Torigoe, K., Ikezaki, K., Shono, T., Maehara, Y., Kuwano, M. et Wada, M. (2000) The specific expression of three novel splice variant forms of human metalloprotease-like disintegrin-like cysteine-rich protein 2 gene in Brain tissues and gliomas. *Jpn J Cancer Res*, **91**, 1001-1006.
- Harris, E.D., Jr. (1990) Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med*, **322**, 1277-1289.
- Hellwig-Burgel, T., Rutkowski, K., Metzen, E., Fandrey, J. et Jelkmann, W. (1999) Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1. *Blood*, **94**, 1561-1567.
- Hiraiwa, A., Yamanaka, K., Kwok, W.W., Mickelson, E.M., Masewicz, S., Hansen, J.A., Radka, S.F. et Nepom, G.T. (1990) Structural requirements for recognition of the HLA-Dw14 class II epitope: a key HLA determinant associated with rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8051-8055.
- Hodge-Dufour, J., Marino, M.W., Horton, M.R., Jungbluth, A., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Noble, P.W., Hunter, C.A. et Pure, E. (1998) Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-inflammatory activities of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13806-13811.
- Hollander, A.P., Corke, K.P., Freemont, A.J. et Lewis, C.E. (2001) Expression of hypoxia-inducible factor 1 α by macrophages in the rheumatoid synovium: implications for targeting of therapeutic genes to the inflamed joint. *Arthritis Rheum*, **44**, 1540-1544.
- Hougaard, S., Loechel, F., Xu, X., Tajima, R., Albrechtsen, R. et Wewer, U.M. (2000) Trafficking of human ADAM 12-L: retention in the trans-Golgi network. *Biochem Biophys Res Commun*, **275**, 261-267.
- Howard, L. et Glynn, P. (1995) Membrane-associated metalloproteinase recognized by characteristic cleavage of myelin basic protein: assay and isolation. *Methods Enzymol*, **248**, 388-395.
- Howard, L., Maciewicz, R.A. et Blobel, C.P. (2000) Cloning and characterization of ADAM28: evidence for autocatalytic pro-domain removal and for cell surface localization of mature ADAM28. *Biochem J*, **348 Pt 1**, 21-27.

- Howard, L., Nelson, K.K., Maciewicz, R.A. et Blobel, C.P. (1999) Interaction of the metalloprotease disintegrins MDC9 and MDC15 with two SH3 domain-containing proteins, endophilin I and SH3PX1. *J Biol Chem*, **274**, 31693-31699.
- Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. et Goeddel, D.V. (1996) TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell*, **84**, 299-308.
- Huang, L.E., Arany, Z., Livingston, D.M. et Bunn, H.F. (1996) Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*, **271**, 32253-32259.
- Huang, L.E., Gu, J., Schau, M. et Bunn, H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7987-7992.
- Iba, K., Albrechtsen, R., Gilpin, B., Frohlich, C., Loechel, F., Zolkiewska, A., Ishiguro, K., Kojima, T., Liu, W., Langford, J.K., Sanderson, R.D., Brakebusch, C., Fassler, R. et Wewer, U.M. (2000) The cysteine-rich domain of human ADAM 12 supports cell adhesion through syndecans and triggers signaling events that lead to beta1 integrin-dependent cell spreading. *J Cell Biol*, **149**, 1143-1156.
- Idriss, H.T. et Naismith, J.H. (2000) TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*, **50**, 184-195.
- Imaizumi, T., Itaya, H., Fujita, K., Kudoh, D., Kudoh, S., Mori, K., Fujimoto, K., Matsumiya, T., Yoshida, H. et Satoh, K. (2000) Expression of tumor necrosis factor-alpha in cultured human endothelial cells stimulated with lipopolysaccharide or interleukin-1alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 410-415.
- Inoue, D., Reid, M., Lum, L., Kratzschmar, J., Weskamp, G., Myung, Y.M., Baron, R. et Blobel, C.P. (1998) Cloning and initial characterization of mouse meltrin beta and analysis of the expression of four metalloprotease-disintegrins in bone cells. *J Biol Chem*, **273**, 4180-4187.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S. et Kaelin, W.G., Jr. (2001) HIF1alpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*, **292**, 464-468.
- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y. et Semenza, G.L. (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*, **12**, 149-162.
- Izumi, Y., Hirata, M., Hasuwa, H., Iwamoto, R., Umata, T., Miyado, K., Tamai, Y., Kurisaki, T., Sehara-Fujisawa, A., Ohno, S. et Mekada, E. (1998) A metalloprotease-disintegrin, MDC9/meltrin-gamma/ADAM9 and PKCdelta are involved in TPA-

induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *Embo J*, **17**, 7260-7272.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. et Ratcliffe, P.J. (2001) Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, **292**, 468-472.

Jawed, S., Gaffney, K. et Blake, D.R. (1997) Intra-articular pressure profile of the knee joint in a spectrum of inflammatory arthropathies. *Ann Rheum Dis*, **56**, 686-689.

Jeong, J.W., Bae, M.K., Ahn, M.Y., Kim, S.H., Sohn, T.K., Bae, M.H., Yoo, M.A., Song, E.J., Lee, K.J. et Kim, K.W. (2002) Regulation and destabilization of HIF-1 α by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, **111**, 709-720.

Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R. et Semenza, G.L. (1996) Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **271**, 17771-17778.

Jiang, B.H., Zheng, J.Z., Leung, S.W., Roe, R. et Semenza, G.L. (1997) Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 α . Modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*, **272**, 19253-19260.

Jue, D.M., Sherry, B., Luedke, C., Manogue, K.R. et Cerami, A. (1990) Processing of newly synthesized cachectin/tumor necrosis factor in endotoxin-stimulated macrophages. *Biochemistry*, **29**, 8371-8377.

Kallio, P.J., Okamoto, K., O'Brien, S., Carrero, P., Makino, Y., Tanaka, H. et Poellinger, L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *Embo J*, **17**, 6573-6586.

Kang, Q., Cao, Y. et Zolkiewska, A. (2000) Metalloprotease-disintegrin ADAM 12 binds to the SH3 domain of Src and activates Src tyrosine kinase in C2C12 cells. *Biochem J*, **352 Pt 3**, 883-892.

Kang, T., Zhao, Y.G., Pei, D., Sucic, J.F. et Sang, Q.X. (2002) Intracellular activation of human adamalysin 19/disintegrin and metalloproteinase 19 by furin occurs via one of the two consecutive recognition sites. *J Biol Chem*, **277**, 25583-25591.

Karin, M. et Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-663.

Karin, M., Liu, Z. et Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 240-246.

- Kassel, O., Sancono, A., Kratzschmar, J., Kreft, B., Stassen, M. et Cato, A.C. (2001) Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J*, **20**, 7108-7116.
- Kermarrec, N., Selloum, S., Plantefevre, G., Chosidow, D., Paoletti, X., Lopez, A., Mantz, J., Desmonts, J.M., Gougerot-Pocidalo, M.A. et Chollet-Martin, S. (2005) Regulation of peritoneal and systemic neutrophil-derived tumor necrosis factor-alpha release in patients with severe peritonitis: role of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme cleavage. *Crit Care Med*, **33**, 1359-1364.
- Kietzmann, T., Roth, U. et Jungermann, K. (1999) Induction of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by mild hypoxia via a hypoxia response element binding the hypoxia-inducible factor-1 in rat hepatocytes. *Blood*, **94**, 4177-4185.
- Kim, E., Nishimura, H. et Baba, T. (2003) Differential localization of ADAM1a and ADAM1b in the endoplasmic reticulum of testicular germ cells and on the surface of epididymal sperm. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**, 313-319.
- Kimura, H., Weisz, A., Ogura, T., Hitomi, Y., Kurashima, Y., Hashimoto, K., D'Acquisto, F., Makuuchi, M. et Esumi, H. (2001) Identification of hypoxia-inducible factor 1 ancillary sequence and its function in vascular endothelial growth factor gene induction by hypoxia and nitric oxide. *J Biol Chem*, **276**, 2292-2298.
- Kirkegaard, T., Pedersen, G., Saermark, T. et Brynskov, J. (2004) Tumour necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) activity in human colonic epithelial cells. *Clin Exp Immunol*, **135**, 146-153.
- Kobayashi, I. et Ziff, M. (1973) Electron microscopic studies of lymphoid cells in the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum*, **16**, 471-486.
- Koch, A.E. (2000) The role of angiogenesis in rheumatoid arthritis: recent developments. *Ann Rheum Dis*, **59 Suppl 1**, i65-71.
- Koong, A.C., Chen, E.Y., Mivechi, N.F., Denko, N.C., Stambrook, P. et Giaccia, A.J. (1994) Hypoxic activation of nuclear factor-kappa B is mediated by a Ras and Raf signaling pathway and does not involve MAP kinase (ERK1 or ERK2). *Cancer Res*, **54**, 5273-5279.
- Kotch, L.E., Iyer, N.V., Laughner, E. et Semenza, G.L. (1999) Defective vascularization of HIF-1alpha-null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Dev Biol*, **209**, 254-267.
- Krane, S.M., Conca, W., Stephenson, M.L., Amento, E.P. et Goldring, M.B. (1990) Mechanisms of matrix degradation in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, **580**, 340-354.

- Kratzschmar, J., Lum, L. et Blobel, C.P. (1996) Metargidin, a membrane-anchored metalloprotease-disintegrin protein with an RGD integrin binding sequence. *J Biol Chem*, **271**, 4593-4596.
- Kriegler, M., Perez, C., DeFay, K., Albert, I. et Lu, S.D. (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell*, **53**, 45-53.
- Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P. et Semenza, G.L. (2003) Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res*, **63**, 1138-1143.
- Kurisaki, T., Masuda, A., Osumi, N., Nabeshima, Y. et Fujisawa-Sehara, A. (1998) Spatially- and temporally-restricted expression of meltrin alpha (ADAM12) and beta (ADAM19) in mouse embryo. *Mech Dev*, **73**, 211-215.
- Kurosaka, M. et Ziff, M. (1983) Immunoelectron microscopic study of the distribution of T cell subsets in rheumatoid synovium. *J Exp Med*, **158**, 1191-1210.
- Lahita, R.G. (1990) Sex hormones and the immune system--Part 1. Human data. *Baillieres Clin Rheumatol*, **4**, 1-12.
- Lamas, M., Campos, J.R. et Silva, A.G. (1997) Identification of a novel glucocorticoid response unit (GRU) in the 5'-flanking region of the mouse IL-2 receptor alpha gene. *Cytokine*, **9**, 973-981.
- Lammich, S., Kojro, E., Postina, R., Gilbert, S., Pfeiffer, R., Jasionowski, M., Haass, C. et Fahrenholz, F. (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3922-3927.
- Lee, P.J., Jiang, B.H., Chin, B.Y., Iyer, N.V., Alam, J., Semenza, G.L. et Choi, A.M. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 mediates transcriptional activation of the heme oxygenase-1 gene in response to hypoxia. *J Biol Chem*, **272**, 5375-5381.
- Lemjabbar, H. et Basbaum, C. (2002) Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to *Staphylococcus aureus* in epithelial cells. *Nat Med*, **8**, 41-46.
- Lendeckel, U., Kohl, J., Arndt, M., Carl-McGrath, S., Donat, H. et Rocken, C. (2005) Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, **131**, 41-48.
- Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V. et Ferrara, N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, **246**, 1306-1309.

- Li, J., Zhang, X., Sejas, D.P., Bagby, G.C. et Pang, Q. (2004) Hypoxia-induced nucleophosmin protects cell death through inhibition of p53. *J Biol Chem*, **279**, 41275-41279.
- Li, X., Kimura, H., Hirota, K., Kasuno, K., Torii, K., Okada, T., Kurooka, H., Yokota, Y. et Yoshida, H. (2005) Synergistic effect of hypoxia and TNF-alpha on production of PAI-1 in human proximal renal tubular cells. *Kidney Int*, **68**, 569-583.
- Lin, Y.C., Sun, G.H., Lee, Y.M., Guo, Y.W. et Liu, H.W. (2001) Cloning and characterization of a complementary DNA encoding a human epididymis-associated disintegrin and metalloprotease 7 protein. *Biol Reprod*, **65**, 944-950.
- Liu, C., Shi, Y., Han, Z., Pan, Y., Liu, N., Han, S., Chen, Y., Lan, M., Qiao, T. et Fan, D. (2003) Suppression of the dual-specificity phosphatase MKP-1 enhances HIF-1 trans-activation and increases expression of EPO. *Biochem Biophys Res Commun*, **312**, 780-786.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. et Karin, M. (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-576.
- Loechel, F., Gilpin, B.J., Engvall, E., Albrechtsen, R. et Wewer, U.M. (1998) Human ADAM 12 (meltrin alpha) is an active metalloprotease. *J Biol Chem*, **273**, 16993-16997.
- Loechel, F., Overgaard, M.T., Oxvig, C., Albrechtsen, R. et Wewer, U.M. (1999) Regulation of human ADAM 12 protease by the prodomain. Evidence for a functional cysteine switch. *J Biol Chem*, **274**, 13427-13433.
- Lok, C.N. et Ponka, P. (1999) Identification of a hypoxia response element in the transferrin receptor gene. *J Biol Chem*, **274**, 24147-24152.
- Luetkeke, N.C., Qiu, T.H., Peiffer, R.L., Oliver, P., Smithies, O. et Lee, D.C. (1993) TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice. *Cell*, **73**, 263-278.
- Lum, L., Reid, M.S. et Blobel, C.P. (1998) Intracellular maturation of the mouse metalloprotease disintegrin MDC15. *J Biol Chem*, **273**, 26236-26247.
- Lum, L., Wong, B.R., Josien, R., Becherer, J.D., Erdjument-Bromage, H., Schlondorff, J., Tempst, P., Choi, Y. et Blobel, C.P. (1999) Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE, a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem*, **274**, 13613-13618.

- Lunn, C.A., Fan, X., Dalie, B., Miller, K., Zavodny, P.J., Narula, S.K. et Lundell, D. (1997) Purification of ADAM 10 from bovine spleen as a TNF α convertase. *FEBS Lett*, **400**, 333-335.
- Ma, X., Sun, J., Papasavvas, E., Riemann, H., Robertson, S., Marshall, J., Bailer, R.T., Moore, A., Donnelly, R.P., Trinchieri, G. et Montaner, L.J. (2000) Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF. *J Immunol*, **164**, 1722-1729.
- MacEwan, D.J. (2002) TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal*, **14**, 477-492.
- Mahon, P.C., Hirota, K. et Semenza, G.L. (2001) FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*, **15**, 2675-2686.
- Majka, S., McGuire, P.G. et Das, A. (2002) Regulation of matrix metalloproteinase expression by tumor necrosis factor in a murine model of retinal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **43**, 260-266.
- Mapp, P.I., Grootveld, M.C. et Blake, D.R. (1995) Hypoxia, oxidative stress and rheumatoid arthritis. *Br Med Bull*, **51**, 419-436.
- Marinova-Mutafchieva, L., Williams, R.O., Mason, L.J., Mauri, C., Feldmann, M. et Maini, R.N. (1997) Dynamics of proinflammatory cytokine expression in the joints of mice with collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol*, **107**, 507-512.
- Martinez, A., Fernandez-Arquero, M., Pascual-Salcedo, D., Conejero, L., Alves, H., Balsa, A. et de la Concha, E.G. (2000) Primary association of tumor necrosis factor-region genetic markers with susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **43**, 1366-1370.
- Maxwell, P.H., Wiesener, M.S., Chang, G.W., Clifford, S.C., Vaux, E.C., Cockman, M.E., Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maher, E.R. et Ratcliffe, P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, **399**, 271-275.
- Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., Berta, M.A., Benizri, E., Bilton, R.L., Dayan, F., Ginouves, A., Berra, E. et Pouyssegur, J. (2004) HIF-1: master and commander of the hypoxic world. A pharmacological approach to its regulation by siRNAs. *Biochem Pharmacol*, **68**, 971-980.
- McDermott, M.F., Aksentijevich, I., Galon, J., McDermott, E.M., Ogunkolade, B.W., Centola, M., Mansfield, E., Gadina, M., Karenko, L., Pettersson, T., McCarthy, J., Frucht, D.M., Aringer, M., Torosyan, Y., Teppo, A.M., Wilson, M., Karaarslan, H.M., Wan, Y., Todd, I., Wood, G., Schlimgen, R., Kumarajeewa, T.R., Cooper, S.M., Vella, J.P., Amos, C.I., Mulley, J., Quane, K.A., Molloy, M.G., Ranki, A.,

- Powell, R.J., Hitman, G.A., O'Shea, J.J. et Kastner, D.L. (1999) Germline mutations in the extracellular domains of the 55 kDa TNF receptor, TNFR1, define a family of dominantly inherited autoinflammatory syndromes. *Cell*, **97**, 133-144.
- Melillo, G., Musso, T., Sica, A., Taylor, L.S., Cox, G.W. et Varesio, L. (1995) A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter. *J Exp Med*, **182**, 1683-1693.
- Merlos-Suarez, A., Ruiz-Paz, S., Baselga, J. et Arribas, J. (2001) Metalloprotease-dependent protransforming growth factor- α ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor- α -converting enzyme. *J Biol Chem*, **276**, 48510-48517.
- Metzen, E. et Ratcliffe, P.J. (2004) HIF hydroxylation and cellular oxygen sensing. *Biol Chem*, **385**, 223-230.
- Mezyk, R., Bzowska, M. et Bereta, J. (2003) Structure and functions of tumor necrosis factor- α converting enzyme. *Acta Biochim Pol*, **50**, 625-645.
- Migaki, G.I., Kahn, J. et Kishimoto, T.K. (1995) Mutational analysis of the membrane-proximal cleavage site of L-selectin: relaxed sequence specificity surrounding the cleavage site. *J Exp Med*, **182**, 549-557.
- Milla, M.E., Leesnitzer, M.A., Moss, M.L., Clay, W.C., Carter, H.L., Miller, A.B., Su, J.L., Lambert, M.H., Willard, D.H., Sheeley, D.M., Kost, T.A., Burkhart, W., Moyer, M., Blackburn, R.K., Pahel, G.L., Mitchell, J.L., Hoffman, C.R. et Becherer, J.D. (1999) Specific sequence elements are required for the expression of functional tumor necrosis factor- α -converting enzyme (TACE). *J Biol Chem*, **274**, 30563-30570.
- Millichip, M.I., Dallas, D.J., Wu, E., Dale, S. et McKie, N. (1998) The metallo-disintegrin ADAM10 (MADM) from bovine kidney has type IV collagenase activity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 594-598.
- Minchenko, A. et Caro, J. (2000) Regulation of endothelin-1 gene expression in human microvascular endothelial cells by hypoxia and cobalt: role of hypoxia responsive element. *Mol Cell Biochem*, **208**, 53-62.
- Minchenko, A., Leshchinsky, I., Opentanova, I., Sang, N., Srinivas, V., Armstead, V. et Caro, J. (2002) Hypoxia-inducible factor-1-mediated expression of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-3 (PFKFB3) gene. Its possible role in the Warburg effect. *J Biol Chem*, **277**, 6183-6187.
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R.J., Johnson, G.L. et Karin, M. (1994) Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, **266**, 1719-1723.

- Minet, E., Arnould, T., Michel, G., Roland, I., Mottet, D., Raes, M., Remacle, J. et Michiels, C. (2000) ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett*, **468**, 53-58.
- Miyazaki, K., Kawamoto, T., Tanimoto, K., Nishiyama, M., Honda, H. et Kato, Y. (2002) Identification of functional hypoxia response elements in the promoter region of the DEC1 and DEC2 genes. *J Biol Chem*, **277**, 47014-47021.
- Mizui, Y., Yamazaki, K., Sagane, K. et Tanaka, I. (1999) cDNA cloning of mouse tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) and partial analysis of its promoter. *Gene*, **233**, 67-74.
- Modur, V., Li, Y., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M. et McIntyre, T.M. (1997) Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest*, **100**, 2752-2756.
- Mohan, M.J., Seaton, T., Mitchell, J., Howe, A., Blackburn, K., Burkhart, W., Moyer, M., Patel, I., Waite, G.M., Becherer, J.D., Moss, M.L. et Milla, M.E. (2002) The tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE): a unique metalloproteinase with highly defined substrate selectivity. *Biochemistry*, **41**, 9462-9469.
- Montero, J.C., Yuste, L., Diaz-Rodriguez, E., Esparis-Ogando, A. et Pandiella, A. (2000) Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme. *Mol Cell Neurosci*, **16**, 631-648.
- Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Carter, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Becherer, J.D. et al. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, **385**, 733-736.
- Moss, M.L., White, J.M., Lambert, M.H. et Andrews, R.C. (2001) TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. *Drug Discov Today*, **6**, 417-426.
- Moxley, G. et Cohen, H.J. (2002) Genetic studies, clinical heterogeneity, and disease outcome studies in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, **28**, 39-58.
- Mueller, C., Corazza, N., Trachsel-Loseth, S., Eugster, H.P., Buhler-Jungo, M., Brunner, T. et Imboden, M.A. (1999) Noncleavable transmembrane mouse tumor necrosis factor-alpha (TNFalpha) mediates effects distinct from those of wild-type TNFalpha in vitro and in vivo. *J Biol Chem*, **274**, 38112-38118.
- Mukhopadhyay, C.K., Mazumder, B. et Fox, P.L. (2000) Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J Biol Chem*, **275**, 21048-21054.

- Mullberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P.C. et Rose-John, S. (1994) The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J Immunol*, **152**, 4958-4968.
- Nath, D., Slocombe, P.M., Stephens, P.E., Warn, A., Hutchinson, G.R., Yamada, K.M., Docherty, A.J. et Murphy, G. (1999) Interaction of metargidin (ADAM-15) with alphavbeta3 and alpha5beta1 integrins on different haemopoietic cells. *J Cell Sci*, **112 (Pt 4)**, 579-587.
- Naughton, D., Whelan, M., Smith, E.C., Williams, R., Blake, D.R. et Grootveld, M. (1993) An investigation of the abnormal metabolic status of synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis by high field proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *FEBS Lett*, **317**, 135-138.
- Neidhart, M., Wehrli, R., Bruhlmann, P., Michel, B.A., Gay, R.E. et Gay, S. (1999) Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **42**, 622-630.
- Nelson, K.K., Schlondorff, J. et Blobel, C.P. (1999) Evidence for an interaction of the metalloprotease-disintegrin tumour necrosis factor alpha convertase (TACE) with mitotic arrest deficient 2 (MAD2), and of the metalloprotease-disintegrin MDC9 with a novel MAD2-related protein, MAD2beta. *Biochem J*, **343 Pt 3**, 673-680.
- Nguyen, S.V. et Claycomb, W.C. (1999) Hypoxia regulates the expression of the adrenomedullin and HIF-1 genes in cultured HL-1 cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, **265**, 382-386.
- Nishi, H., Nakada, T., Kyo, S., Inoue, M., Shay, J.W. et Isaka, K. (2004) Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol*, **24**, 6076-6083.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K. et Ichijo, H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*, **2**, 389-395.
- Oikawa, M., Abe, M., Kurosawa, H., Hida, W., Shirato, K. et Sato, Y. (2001) Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 39-43.
- Ou, X.M., Storrington, J.M., Kushwaha, N. et Albert, P.R. (2001) Heterodimerization of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at a novel negative response element of the 5-HT1A receptor gene. *J Biol Chem*, **276**, 14299-14307.
- Park, Y.C., Ye, H., Hsia, C., Segal, D., Rich, R.L., Liou, H.C., Myszkowski, D.G. et Wu, H. (2000) A novel mechanism of TRAF signaling revealed by structural and functional analyses of the TRADD-TRAF2 interaction. *Cell*, **101**, 777-787.

- Patel, I.R., Attur, M.G., Patel, R.N., Stuchin, S.A., Abagyan, R.A., Abramson, S.B. et Amin, A.R. (1998) TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha. *J Immunol*, **160**, 4570-4579.
- Pederson, T. et Aebi, U. (2002) Actin in the nucleus: what form and what for? *J Struct Biol*, **140**, 3-9.
- Peiretti, F., Canault, M., Deprez-Beauclair, P., Berthet, V., Bonardo, B., Juhan-Vague, I. et Nalbone, G. (2003) Intracellular maturation and transport of tumor necrosis factor alpha converting enzyme. *Exp Cell Res*, **285**, 278-285.
- Perl, A. (1999) Mechanisms of viral pathogenesis in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis*, **58**, 454-461.
- Pervin, S., Singh, R., Freije, W.A. et Chaudhuri, G. (2003) MKP-1-induced dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase is essential for triggering nitric oxide-induced apoptosis in human breast cancer cell lines: implications in breast cancer. *Cancer Res*, **63**, 8853-8860.
- Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., Stocking, K.L., Sunnarborg, S.W., Lee, D.C., Russell, W.E., Castner, B.J., Johnson, R.S., Fitzner, J.N., Boyce, R.W., Nelson, N., Kozlosky, C.J., Wolfson, M.F., Rauch, C.T., Cerretti, D.P., Paxton, R.J., March, C.J. et Black, R.A. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, **282**, 1281-1284.
- Peters, C.L., Morris, C.J., Mapp, P.I., Blake, D.R., Lewis, C.E. et Winrow, V.R. (2004) The transcription factors hypoxia-inducible factor 1alpha and Ets-1 colocalize in the hypoxic synovium of inflamed joints in adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, **50**, 291-296.
- Poindexter, K., Nelson, N., DuBose, R.F., Black, R.A. et Cerretti, D.P. (1999) The identification of seven metalloproteinase-disintegrin (ADAM) genes from genomic libraries. *Gene*, **237**, 61-70.
- Primakoff, P., Hyatt, H. et Tredick-Kline, J. (1987) Identification and purification of a sperm surface protein with a potential role in sperm-egg membrane fusion. *J Cell Biol*, **104**, 141-149.
- Primakoff, P. et Myles, D.G. (2000) The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet*, **16**, 83-87.
- Pugh, C.W., O'Rourke, J.F., Nagao, M., Gleadle, J.M. et Ratcliffe, P.J. (1997) Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit. *J Biol Chem*, **272**, 11205-11214.

- Qi, H., Rand, M.D., Wu, X., Sestan, N., Wang, W., Rakic, P., Xu, T. et Artavanis-Tsakonas, S. (1999) Processing of the notch ligand delta by the metalloprotease Kuzbanian. *Science*, **283**, 91-94.
- Qu, Z., Garcia, C.H., O'Rourke, L.M., Planck, S.R., Kohli, M. et Rosenbaum, J.T. (1994) Local proliferation of fibroblast-like synoviocytes contributes to synovial hyperplasia. Results of proliferating cell nuclear antigen/cyclin, c-myc, and nucleolar organizer region staining. *Arthritis Rheum*, **37**, 212-220.
- Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., Cerretti, D.P., Kozlosky, C.J., Blanton, R.A., Shows, D., Peschon, J.J. et Black, R.A. (2000) Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*, **275**, 14608-14614.
- Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D. et Pouyssegur, J. (1999) p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J Biol Chem*, **274**, 32631-32637.
- Richard, D.E., Berra, E. et Pouyssegur, J. (2000) Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, **275**, 26765-26771.
- Richman, A.I., Su, E.Y. et Ho, G., Jr. (1981) Reciprocal relationship of synovial fluid volume and oxygen tension. *Arthritis Rheum*, **24**, 701-705.
- Rio, C., Buxbaum, J.D., Peschon, J.J. et Corfas, G. (2000) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is required for cleavage of erbB4/HER4. *J Biol Chem*, **275**, 10379-10387.
- Roberts, C.M., Tani, P.H., Bridges, L.C., Laszik, Z. et Bowditch, R.D. (1999) MDC-L, a novel metalloprotease disintegrin cysteine-rich protein family member expressed by human lymphocytes. *J Biol Chem*, **274**, 29251-29259.
- Roberts, L. et McColl, G.J. (2004) Tumour necrosis factor inhibitors: risks and benefits in patients with rheumatoid arthritis. *Intern Med J*, **34**, 687-693.
- Roghani, M., Becherer, J.D., Moss, M.L., Atherton, R.E., Erdjument-Bromage, H., Arribas, J., Blackburn, R.K., Weskamp, G., Tempst, P. et Blobel, C.P. (1999) Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem*, **274**, 3531-3540.
- Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M. et Wenger, R.H. (1997) Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *J Biol Chem*, **272**, 20055-20062.
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G. et

- Mantovani, A. (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*, **6**, 315-325.
- Rose-John, S. et Heinrich, P.C. (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J*, **300** (Pt 2), 281-290.
- Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M. et Goeddel, D.V. (1995) TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science*, **269**, 1424-1427.
- Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J. et Goeddel, D.V. (1994) A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, **78**, 681-692.
- Sagane, K., Ohya, Y., Hasegawa, Y. et Tanaka, I. (1998) Metalloproteinase-like, disintegrin-like, cysteine-rich proteins MDC2 and MDC3: novel human cellular disintegrins highly expressed in the brain. *Biochem J*, **334** (Pt 1), 93-98.
- Sandau, K.B., Zhou, J., Kietzmann, T. et Brune, B. (2001) Regulation of the hypoxia-inducible factor 1alpha by the inflammatory mediators nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in contrast to desferroxamine and phenylarsine oxide. *J Biol Chem*, **276**, 39805-39811.
- Schlondorff, J., Becherer, J.D. et Blobel, C.P. (2000) Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J*, **347** Pt 1, 131-138.
- Schlondorff, J. et Blobel, C.P. (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci*, **112** (Pt 21), 3603-3617.
- Schoneveld, O.J., Gaemers, I.C. et Lamers, W.H. (2004) Mechanisms of glucocorticoid signalling. *Biochim Biophys Acta*, **1680**, 114-128.
- Schwettmann, L. et Tschesche, H. (2001) Cloning and expression in *Pichia pastoris* of metalloprotease domain of ADAM 9 catalytically active against fibronectin. *Protein Expr Purif*, **21**, 65-70.
- Seals, D.F. et Courtneidge, S.A. (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, **17**, 7-30.
- Segard-Maurel, I., Rajkowski, K., Jibard, N., Schweizer-Groyer, G., Baulieu, E.E. et Cadepond, F. (1996) Glucocorticosteroid receptor dimerization investigated by analysis of receptor binding to glucocorticosteroid responsive elements using a monomer-dimer equilibrium model. *Biochemistry*, **35**, 1634-1642.
- Seldin, M.F., Amos, C.I., Ward, R. et Gregersen, P.K. (1999) The genetics revolution and the assault on rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **42**, 1071-1079.

- Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, **3**, 721-732.
- Semenza, G.L., Jiang, B.H., Leung, S.W., Passantino, R., Concordet, J.P., Maire, P. et Giallongo, A. (1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **271**, 32529-32537.
- Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M. et Wang, G.L. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **269**, 23757-23763.
- Semenza, G.L. et Wang, G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, **12**, 5447-5454.
- Shi, Z., Xu, W., Loechel, F., Wewer, U.M. et Murphy, L.J. (2000) ADAM 12, a disintegrin metalloprotease, interacts with insulin-like growth factor-binding protein-3. *J Biol Chem*, **275**, 18574-18580.
- Shingu, M., Nagai, Y., Isayama, T., Naono, T. et Nobunaga, M. (1993) The effects of cytokines on metalloproteinase inhibitors (TIMP) and collagenase production by human chondrocytes and TIMP production by synovial cells and endothelial cells. *Clin Exp Immunol*, **94**, 145-149.
- Shirakabe, K., Wakatsuki, S., Kurisaki, T. et Fujisawa-Sehara, A. (2001) Roles of Meltrin beta /ADAM19 in the processing of neuregulin. *J Biol Chem*, **276**, 9352-9358.
- Silman, A.J., MacGregor, A.J., Thomson, W., Holligan, S., Carthy, D., Farhan, A. et Ollier, W.E. (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *Br J Rheumatol*, **32**, 903-907.
- Silver, I.A. (1975) Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **271**, 261-272.
- Skovronsky, D.M., Moore, D.B., Milla, M.E., Doms, R.W. et Lee, V.M. (2000) Protein kinase C-dependent alpha-secretase competes with beta-secretase for cleavage of amyloid-beta precursor protein in the trans-golgi network. *J Biol Chem*, **275**, 2568-2575.
- Smith, C.A. et Arnett, F.C. (1991) Epidemiologic aspects of rheumatoid arthritis. Current immunogenetic approach. *Clin Orthop Relat Res*, 23-35.
- Sodhi, A., Montaner, S., Patel, V., Zohar, M., Bais, C., Mesri, E.A. et Gutkind, J.S. (2000) The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through

mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Res*, **60**, 4873-4880.

- Solomon, K.A., Covington, M.B., DeCicco, C.P. et Newton, R.C. (1997) The fate of pro-TNF-alpha following inhibition of metalloprotease-dependent processing to soluble TNF-alpha in human monocytes. *J Immunol*, **159**, 4524-4531.
- Solomon, K.A., Pesti, N., Wu, G. et Newton, R.C. (1999) Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion. *J Immunol*, **163**, 4105-4108.
- Soond, S.M., Everson, B., Riches, D.W. et Murphy, G. (2005) ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNFalpha-converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. *J Cell Sci*, **118**, 2371-2380.
- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H. et Harris, A.L. (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res*, **61**, 6669-6673.
- Spector, T.D., Cicuttini, F., Baker, J., Loughlin, J. et Hart, D. (1996) Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *Bmj*, **312**, 940-943.
- Srour, N., Lebel, A., McMahon, S., Fournier, I., Fugere, M., Day, R. et Dubois, C.M. (2003) TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett*, **554**, 275-283.
- Stamenkovic, I. (1995) The L-selectin adhesion system. *Curr Opin Hematol*, **2**, 68-75.
- Stanger, B.Z., Leder, P., Lee, T.H., Kim, E. et Seed, B. (1995) RIP: a novel protein containing a death domain that interacts with Fas/APO-1 (CD95) in yeast and causes cell death. *Cell*, **81**, 513-523.
- Subramanian, S. et Handa, R. (2004) Biological agents in rheumatoid arthritis. *J Postgrad Med*, **50**, 293-299.
- Sunderkotter, C., Steinbrink, K., Goebeler, M., Bhardwaj, R. et Sorg, C. (1994) Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol*, **55**, 410-422.
- Sunnarborg, S.W., Hinkle, C.L., Stevenson, M., Russell, W.E., Raska, C.S., Peschon, J.J., Castner, B.J., Gerhart, M.J., Paxton, R.J., Black, R.A. et Lee, D.C. (2002) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability. *J Biol Chem*, **277**, 12838-12845.
- Symons, J.A., Young, P.R. et Duff, G.W. (1995) Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1714-1718.

- Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A. et Cairo, G. (1999) Transferrin receptor induction by hypoxia. HIF-1-mediated transcriptional activation and cell-specific post-transcriptional regulation. *J Biol Chem*, **274**, 24142-24146.
- Takahashi, Y., Takahashi, S., Shiga, Y., Yoshimi, T. et Miura, T. (2000) Hypoxic induction of prolyl 4-hydroxylase alpha (I) in cultured cells. *J Biol Chem*, **275**, 14139-14146.
- Takemura, S., Braun, A., Crowson, C., Kurtin, P.J., Cofield, R.H., O'Fallon, W.M., Goronzy, J.J. et Weyand, C.M. (2001) Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J Immunol*, **167**, 1072-1080.
- Tang, P., Hung, M.C. et Klostergaard, J. (1996) Length of the linking domain of human pro-tumor necrosis factor determines the cleavage processing. *Biochemistry*, **35**, 8226-8233.
- Tazuke, S.I., Mazure, N.M., Sugawara, J., Carland, G., Faessen, G.H., Suen, L.F., Irwin, J.C., Powell, D.R., Giaccia, A.J. et Giudice, L.C. (1998) Hypoxia stimulates insulin-like growth factor binding protein 1 (IGFBP-1) gene expression in HepG2 cells: a possible model for IGFBP-1 expression in fetal hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10188-10193.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. et Ichijo, H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, **2**, 222-228.
- Tomczuk, M., Takahashi, Y., Huang, J., Murase, S., Mistretta, M., Klaffky, E., Sutherland, A., Bolling, L., Coonrod, S., Marcinkiewicz, C., Sheppard, D., Stepp, M.A. et White, J.M. (2003) Role of multiple beta1 integrins in cell adhesion to the disintegrin domains of ADAMs 2 and 3. *Exp Cell Res*, **290**, 68-81.
- Tracey, K.J. et Cerami, A. (1993) Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. *Annu Rev Cell Biol*, **9**, 317-343.
- Treuhart, P.S. et DJ, M.C. (1971) Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases. *Arthritis Rheum*, **14**, 475-484.
- Tsai, S.Y., Carlstedt-Duke, J., Weigel, N.L., Dahlman, K., Gustafsson, J.A., Tsai, M.J. et O'Malley, B.W. (1988) Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell*, **55**, 361-369.
- Tsou, C.L., Haskell, C.A. et Charo, I.F. (2001) Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem*, **276**, 44622-44626.
- Udalova, I.A., Nedospasov, S.A., Webb, G.C., Chaplin, D.D. et Turetskaya, R.L. (1993) Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. *Genomics*, **16**, 180-186.

- Van Wart, H.E. et Birkedal-Hansen, H. (1990) The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5578-5582.
- Vincent, B., Paitel, E., Saftig, P., Frobert, Y., Hartmann, D., De Strooper, B., Grassi, J., Lopez-Perez, E. et Checler, F. (2001) The disintegrins ADAM10 and TACE contribute to the constitutive and phorbol ester-regulated normal cleavage of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, **276**, 37743-37746.
- von der Ahe, D., Nischan, C., Kunz, C., Otte, J., Knies, U., Oderwald, H. et Wasylyk, B. (1993) Ets transcription factor binding site is required for positive and TNF alpha-induced negative promoter regulation. *Nucleic Acids Res*, **21**, 5636-5643.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V. et Boldin, M.P. (1999) Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*, **17**, 331-367.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A. et Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 5510-5514.
- Wang, G.L. et Semenza, G.L. (1993) Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*, **82**, 3610-3615.
- Wang, G.L. et Semenza, G.L. (1995) Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, **270**, 1230-1237.
- Wenger, R.H. (2002) Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J*, **16**, 1151-1162.
- Weskamp, G., Kratzschmar, J., Reid, M.S. et Blobel, C.P. (1996) MDC9, a widely expressed cellular disintegrin containing cytoplasmic SH3 ligand domains. *J Cell Biol*, **132**, 717-726.
- White, J.M. (2003) ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions. *Curr Opin Cell Biol*, **15**, 598-606.
- Wilkinson, L.S., Pitsillides, A.A., Worrall, J.G. et Edwards, J.C. (1992) Light microscopic characterization of the fibroblast-like synovial intimal cell (synoviocyte). *Arthritis Rheum*, **35**, 1179-1184.
- Wolfe, F., Kleinheksel, S.M. et Khan, M.A. (1988) Familial vs sporadic rheumatoid arthritis: a comparison of the demographic and clinical characteristics of 956 patients. *J Rheumatol*, **15**, 400-404.

- Wykoff, C.C., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L. et Ratcliffe, P.J. (2000) Identification of novel hypoxia dependent and independent target genes of the von Hippel-Lindau (VHL) tumour suppressor by mRNA differential expression profiling. *Oncogene*, **19**, 6297-6305.
- Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G.R. et Karin, M. (2000) MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5243-5248.
- Xia, Y., Wu, Z., Su, B., Murray, B. et Karin, M. (1998) JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev*, **12**, 3369-3381.
- Xu, R., Cai, J., Xu, T., Zhou, W., Ying, B., Deng, K., Zhao, S. et Li, C. (1999) Molecular cloning and mapping of a novel ADAM gene (ADAM29) to human chromosome 4. *Genomics*, **62**, 537-539.
- Yagami-Hiromasa, T., Sato, T., Kurisaki, T., Kamijo, K., Nabeshima, Y. et Fujisawa-Sehara, A. (1995) A metalloprotease-disintegrin participating in myoblast fusion. *Nature*, **377**, 652-656.
- Yamamoto, S., Higuchi, Y., Yoshiyama, K., Shimizu, E., Kataoka, M., Hijiya, N. et Matsuura, K. (1999) ADAM family proteins in the immune system. *Immunol Today*, **20**, 278-284.
- Yatabe, N., Kyo, S., Maida, Y., Nishi, H., Nakamura, M., Kanaya, T., Tanaka, M., Isaka, K., Ogawa, S. et Inoue, M. (2004) HIF-1-mediated activation of telomerase in cervical cancer cells. *Oncogene*, **23**, 3708-3715.
- Yoshinaka, T., Nishii, K., Yamada, K., Sawada, H., Nishiwaki, E., Smith, K., Yoshino, K., Ishiguro, H. et Higashiyama, S. (2002) Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potential metalloprotease activity. *Gene*, **282**, 227-236.
- Yoshiyama, K., Higuchi, Y., Kataoka, M., Matsuura, K. et Yamamoto, S. (1997) CD156 (human ADAM8): expression, primary amino acid sequence, and gene location. *Genomics*, **41**, 56-62.
- Youssef, P.P., Kraan, M., Breedveld, F., Bresnihan, B., Cassidy, N., Cunnane, G., Emery, P., Fitzgerald, O., Kane, D., Lindblad, S., Reece, R., Veale, D. et Tak, P.P. (1998) Quantitative microscopic analysis of inflammation in rheumatoid arthritis synovial membrane samples selected at arthroscopy compared with samples obtained blindly by needle biopsy. *Arthritis Rheum*, **41**, 663-669.

- Yuasa, T., Ohno, S., Kehrl, J.H. et Kyriakis, J.M. (1998) Tumor necrosis factor signaling to stress-activated protein kinase (SAPK)/Jun NH2-terminal kinase (JNK) and p38. Germinal center kinase couples TRAF2 to mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 1 and SAPK while receptor interacting protein associates with a mitogen-activated protein kinase kinase kinase upstream of MKK6 and p38. *J Biol Chem*, **273**, 22681-22692.
- Yujiri, T., Ware, M., Widmann, C., Oyer, R., Russell, D., Chan, E., Zaitsev, Y., Clarke, P., Tyler, K., Oka, Y., Fanger, G.R., Henson, P. et Johnson, G.L. (2000) MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7272-7277.
- Zhang, Y., Jiang, J., Black, R.A., Baumann, G. et Frank, S.J. (2000) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) is a growth hormone binding protein (GHBP) sheddase: the metalloprotease TACE/ADAM-17 is critical for (PMA-induced) GH receptor proteolysis and GHBP generation. *Endocrinology*, **141**, 4342-4348.
- Zhao, J., Chen, H., Wang, Y.L. et Warburton, D. (2001) Abrogation of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme inhibits embryonic lung morphogenesis in culture. *Int J Dev Biol*, **45**, 623-631.
- Zhou, J., Fandrey, J., Schumann, J., Tiegs, G. et Brune, B. (2003) NO and TNF-alpha released from activated macrophages stabilize HIF-1alpha in resting tubular LLC-PK1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, **284**, C439-446.
- Zhou, M., Graham, R., Russell, G. et Croucher, P.I. (2001) MDC-9 (ADAM-9/Meltrin gamma) functions as an adhesion molecule by binding the alpha(v)beta(5) integrin. *Biochem Biophys Res Commun*, **280**, 574-580.
- Zvaifler, N.J. et Firestein, G.S. (1994) Pannus and pannocytes. Alternative models of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, **37**, 783-789.
- Zvaifler, N.J., Tsai, V., Alsalameh, S., von Kempis, J., Firestein, G.S. et Lotz, M. (1997) Pannocytes: distinctive cells found in rheumatoid arthritis articular cartilage erosions. *Am J Pathol*, **150**, 1125-1138.